

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Carrera de Ingeniería Agronómica**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN “*IN VITRO*” DE CAPULÍ (*Prunus  
serotina ssp capulí Cav*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES.  
QUITO, PICHINCHA.**

**TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**PATRICIO WILFRIDO URCUANGO CAYAMBE**

**QUITO-ECUADOR**

**2014**

## **DEDICATORIA**

A Dios por guiarme y las bendiciones generadas en el transcurso de mi vida

A mis padres María Elena Cayambe y Santos Urcuango por su esfuerzo, amor y apoyo incondicional durante mi segundo triunfo gracias por estar aquí.

A mis hermanos: Alberto, Rosa, Juan, Guisela y Johanna por su apoyo y confianza generados en esta etapa de mi vida

A mi esposa Diana Carolina Vilaña por ser la persona que amo en esta vida y sobretodo el gran apoyo generado en el transcurso de este proyecto de investigación

## **AGRADECIMIENTO**

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador por haberme instruido y formado durante la carrera.

Al Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, por permitirme realizar ésta investigación.

Al Ing. Agr. Valdano Tafur por el inmenso aporte, antes, durante y después de la investigación.

Al Ing. Agr. Lenin Ron por su conocimiento y sugerencias para la realización de este proyecto de investigación.

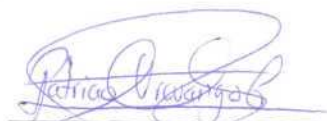
A todos mis amigos y compañeros por su apoyo durante la carrera y me han apoyado para lograr cumplir la meta anhelada

## AUTORIZACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL

Yo, **PATRICIO WILFRIDO URCUANGO CAYAMBE**. En calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN “IN VITRO” DE CAPULÍ (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. QUITO, PICHINCHA”**. **“EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION "IN VITRO" CAPULÍ (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) FROM NODAL SEGMENTS. QUITO, PICHINCHA”**, por la presente autorizo a la **UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 22 de Noviembre de 2014



**FIRMA**

**C.C. 1719225367**

**Email: pattourcuango@gmail.com**

## CERTIFICADO

En calidad de tutor de trabajo de graduación cuyo título es: **“EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN “IN VITRO” DE CAPULÍ (*Prunus serotina* ssp *capulí* Cav) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. QUITO, PICHINCHA.”** presentado por el señor Patricio Wilfrido Urcuango Cayambe, previo a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo considero que el proyecto reúne los requisitos necesarios

Quito, 22 de Noviembre del 2014



---

Ing. Agr. Valdano Tafur.  
**TUTOR**

Tumbaco, 22 de Noviembre del 2014

Ingeniero

Carlos Ortega

**DIRECTOR DE CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

Presente.

Señor Director:

Luego de las revisiones técnicas realizadas por mi persona del trabajo de graduación **EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN “IN VITRO” DE CAPULÍ (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. QUITO, PICHINCHA** llevada a cabo por parte del señor egresado: **PATRICIO WILFRIDO URCUANGO CAYAMBE** de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha concluido de manera exitosa, consecuentemente la indicada estudiante podrá continuar con los trámites de graduación correspondientes de acuerdo a lo que estipula las normativas y disposiciones legales.

Por la atención que se digne dar a la presente, reitero mi agradecimiento.

Atentamente,



---

Ing. Agr. Valdano Tafur.

**TUTOR**

**EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN "IN VITRO" DE CAPULÍ (*Prunus  
serotina ssp capulí Cav*) A PARTIR DE SEGMENTOS  
NODALES. QUITO, PICHINCHA.**

**APROBADO POR:**

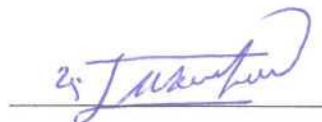
**Ing. Agr. Valdano Tafur  
TUTOR DE TESIS**



**Ing. Aida Arteaga, M.Sc.  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



**Ing. Agr. Juan León, M.Sc.  
PRIMER VOCAL**



**Ing. Agr. Lenin Ron, M.Sc.  
SEGUNDO VOCAL**



**2014**

# CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINAS
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Objetivo General	2
1.2 Objetivos Específicos	2
1.3 Hipótesis	3
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1 Origen	4
2.2 Clasificación Taxonómica	4
2.3 Sinonimia de la especie	4
2.4 Nombre Vernáculo	4
2.5 Distribución Geográfica	4
2.6 Descripción Botánica	5
2.7 Distribución Ecológica	6
2.8 Importancia	6
2.9 Valor nutritivo	6
2.10 Usos	7
2.11 Métodos de propagación	8
2.12 Variedades	9
2.13 La micro propagación	9
2.14 Etapas del cultivo in vitro	9
2.15 Medios de cultivo	12
2.16 Fitohormonas	12
2.17 Vitaminas	14
2.18 pH del medio	14
2.19 Agentes gelificantes	14
2.20 Cultivo in vitro	15
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	16
3.1 Materiales	16
3.2 Métodos	18
3.3 Variables y métodos de evaluación	23
<b>4. RESULTADOS</b>	26
4.1 Primera Fase: Establecimiento de yemas apicales	26
4.2 Segunda Fase: Brotación de yemas apicales	35
4.3 Tercera Fase: Enraizamiento	47
4.4 Análisis Financiero	59



<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINAS</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	63
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	64
<b>7. RESUMEN</b>	65
<b>SUMMARY</b>	66
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	67
<b>9. ANEXOS</b>	75

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO	PÁG.
1 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a la mitad de concentración de sales (MS ½) para cultivo in vitro	75
2 Composición del medio de cultivo Chu (N6) a la mitad de concentración de sales (N6) para cultivo in vitro	76
3 Composición del medio de cultivo Woody plant medium a la mitad de concentración de sales (WPM ½) para cultivo in vitro	77
4 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a labrotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	78
5 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable número de yemas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	78
6 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a longitud del brote en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	79
7 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	79
8 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a longitud de la raíz en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	80
9 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a número de raíces en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	80
10 Datos de la variable días a labrotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	81
11 Datos de la variable longitud del brote en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	81
12 Datos de la variable número de yemas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	82

ANEXO	PÁG.
13 Datos de la variable porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	82
14 Datos de la variable longitud de la raíz en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	83
15 Datos de la variable número de raíces en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	83
16 Costos de producción en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ) a partir de segmentos nodales. Quito, Pichincha. 2014	84
17 Costos variables por tratamiento utilizados para la desinfección en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ) a partir de segmentos nodales. Quito, Pichincha. 2014	86
18 Costos variables por tratamiento utilizados para la etapa de brotación	87
19 Costos variables por tratamiento utilizados para la fase de enraizamiento	88
20 Fotografía de selección, lavado, desinfección de explantes para la micropropagación <i>in vitro</i> de capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ) Quito, Pichincha. 2014	89

## LISTAS DE CUADROS

CUADRO	PÁG.
1 Composición bromatológico del fruto de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> )	7
2 Característica de las variedades del fruto de capulí	9
3 Concentración de Hipoclorito de sodio evaluado para la desinfección de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	18
4 Tiempo de inmersión evaluado para la desinfección de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	18
5 Medios de cultivo evaluados para la brotación de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	19
6 Niveles de Bencilaminopurina (BAP) evaluados para la brotación de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	19
7 Tratamientos para inducir la brotación de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	20
8 Medios de cultivo evaluados para el enraizamiento de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	20
9 Niveles de Ácido Indol Butírico (IBA) evaluados para el enraizamiento de yemas apicales de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	21
10 Tratamientos para inducir el enraizamiento de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	21
11 Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de medios de cultivo para la inducción a la brotación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	22
12 Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de medios de cultivo para la inducción de enraizamiento de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	22
13 Evaluación de hipoclorito de sodio para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación in vitro de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	26
14 Prueba de chi cuadrado para el hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión en la variable contaminación en la fase de desinfección en la micropropagación in vitro de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	26
15 Evaluación del factor hipoclorito de sodio para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación in vitro de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	28

<b>CUADRO</b>	<b>PAG.</b>
16 Prueba de chi cuadrado para el factor hipoclorito de sodio para la variable contaminación en la fase de desinfección en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014	28
17 Evaluación del factor tiempo de inmersión para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	30
18 Prueba de chi cuadrado para la variable tiempo de inmersión en la fase de desinfección en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014	30
19 Evaluación de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión para la variable viabilidad en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	31
20 Prueba de chi cuadrado para el hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión en la variable viabilidad en la desinfección de la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014	31
21 Evaluación del factor hipoclorito de sodio para la variable porcentaje de viabilidad en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	32
22 Prueba de chi cuadrado para el factor hipoclorito de sodio en la variable viabilidad en la fase de desinfección en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	32
23 Evaluación del factor tiempo de inmersión para la variable porcentaje de viabilidad en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	33
24 Prueba de chi cuadrado para la variable tiempo de inmersión en la fase de desinfección en la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014	34
25 Análisis de la varianza para la variable formación de brotes, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación <i>in vitro</i> de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	35
26 Promedios para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	36

CUADRO	PAG.
27 Tukey al 5% para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	37
28 Tukey al 5% para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de la interacción M x B para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	38
29 Análisis de la varianza para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	39
30 Promedios para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	40
31 Tukey al 5% para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	41
32 Tukey al 5% para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de la interacción M x B para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	42
33 Análisis de la varianza para la variable de altura del brote, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	44
34 Promedios para la variable altura del brote, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014..	44
35 Tukey al 5% para la variable altura del brote, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	45
36 Tukey al 5% para la variable altura del brote, en la evaluación de la interacción MxB para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	46
37 Análisis de la varianza para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	48
38 DMS al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	48

CUADRO	PAG.
39 Tukey al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación in vitro de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	49
40 Tukey al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de la interacción M x I para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	50
41 Análisis de la varianza para la variable longitud de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	51
42 Promedios para la variable longitud de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	52
43 Promedio para la variable longitud de raíces, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	53
44 Promedios para la variable longitud de raíces, en la evaluación de la interacción MxI para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	54
45 Análisis de la varianza para la variable número de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	55
46 Promedios para la variable número de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	56
47 Tukey al 5% para la variable raíces por vitroplántula, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014	57
48 Tukey al 5% para la variable raíces por vitroplántula, en la evaluación de la interacción MxI para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	58
49 Costos que varían y beneficios netos para la desinfección in vitro de capulí	60
50 Tasa de retorno marginal para la desinfección in vitro de capulí.	60
51 Costos que varían y beneficios netos para la fase de brotación in vitro de capulí	61
52 Tasa de retorno marginal para la fase de brotación in vitro de capulí	61
53 Costos que varían y beneficios netos para la fase de enraizamiento in vitro de capulí	62
54 Tasa de retorno marginal para la fase de enraizamiento in vitro de capulí	62

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO	PAG
1 Promedios de la evaluación contaminación para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	27
2 Promedios del factor Hipoclorito de sodio en la evaluación contaminación para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	28
3 Promedios de la evaluación tiempos de inmersión para la desinfección en la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	30
4 Promedios de la concentración de NaClO y tiempo de inmersión para la variable viabilidad en la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	31
5 Promedios de la evaluación viabilidad para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	33
6 Promedios de la evaluación tiempos de inmersión para la viabilidad en la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	34
7 Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable días a la formación de brotes para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	36
8 Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable días a la formación de brotes para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	37
9 Promedio de días a la formación de brotes en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	39
10 Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable número de yemas formadas para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	41
11 Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable número de yemas formadas para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	42
12 Promedio de número de yemas formadas en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 201	43
13 Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable altura del brote, para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	45



GRÁFICO	PAG
14 Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable altura del brote, para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	46
15 Promedio de altura del brote en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	47
16 Promedio para la evaluación de medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes enraizados, para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	49
17 Promedio para la evaluación de dosis de IBA en la variable porcentaje de explantes enraizados, formadas para la micropropagación in vitro de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014..	50
18 Promedio de porcentaje de explantes enraizados en la evaluación de la interacción MXI la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	51
19 Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable longitud de raíces, para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014	53
20 Promedios de la evaluación de dosis de IBA en la variable longitud de raíces para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	54
21 Promedio de la longitud de raíces en la evaluación de la interacción MXI la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	55
22 Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable número de raíces, para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina ssp capulí Cav</i> ). Quito, Pichincha. 2014.	57
23 Promedios de la evaluación de dosis de IBA en la variable raíces por vitroplántula, formadas para la micropropagación de Capulí ( <i>Prunus serotina spp capuli</i> ). Quito, Pichincha. 2014. Quito, Pichincha. 2014.	58

# **EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA MICROPROPAGACIÓN “IN VITRO” DE CAPULÍ (*Prunus serotina* ssp *capulí* Cav) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. QUITO, PICHINCHA.**

## **RESUMEN**

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, se realizó la evaluación del efecto de medios de cultivo m1 (MS ½), y m2 (N6) y dosis de 6-BAP b0 (0.0 ppm), b1 (0.3 ppm), b2 (0.6 ppm) y b3 (0.9 ppm), en la fase de enraizamiento se incluyó el efecto de medios de cultivo m1 (MS ½), y m2 (WPM ½) y las dosis respectivas de IBA, i0 (0.0 ppm), i1 (1.0 ppm), i2 (2.0 ppm) e i3 (3.0 ppm). Se utilizó un DCA con un arreglo factorial 2 x 4 con seis observaciones. Los principales resultados establece que: el m1 (MS ½), resultó ser el medio que determinó el menor tiempo a la aparición de los brotes de 11,35 días, se observó que el testigo b0 (0.0 ppm), alcanzó mejores resultados en la altura y yemas de brotes obtenidos. El m1 (WPM ½), suplementado con 2 ppm de IBA, fue el medio de mayor resultado de 64.25 % enraizados y 3.32 raíces por vitroplántula.

**Palabras claves:** CAPULÍ, PRUNUS SEROTINA, SEGMENTOS NODALES, IN VITRO, MICROPROPAGACIÓN

**EVALUATION OF CULTURE MEDIA FOR MICROPROPAGATION "IN VITRO" CAPULÍ (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) FROM NODAL SEGMENTS. QUITO, PICHINCHA.**

**Summary**

In the laboratory of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences of the Central University of Ecuador, the evaluation of the effect of culture media m1 ( $\frac{1}{2}$  MS) and m2 (N6) and doses of 6-BAP b0 (0.0 ppm) was performed , b1 (0.3 ppm), b2 (0.6 ppm) and b3 (0.9 ppm) in the rooting phase know I include the effect of culture media m1 (MS  $\frac{1}{2}$ ) and m2 (WPM  $\frac{1}{2}$ ) and the respective doses of IBA , i0 (0.0. ppm), i1 (1.0 ppm), i2 (2.0 ppm) and i3 (3.0 ppm). A DCA was utilized a 2 x 4 factorial arrangement with six observations. The main results states: m1 ( $\frac{1}{2}$  MS), the medium was determined to be the shortest time to the onset of outbreaks of 11.35 days it was noted that the control b0 (0.0 ppm) achieved better results in the height and shoot tips obtained. M1 (WPM  $\frac{1}{2}$ ) supplemented with 2 ppm of IBA was the highest average result of 64.25% and 3.32 roots rooted vitroplántula.

**Keywords:** CHERRY TREE, PRUNUS SEROTINA, NODAL SEGMENTS, IN VITRO, MICROPROPAGATION

## 1. INTRODUCCIÓN

El Ecuador es uno de los países con mayor número de especies por superficie de área, pues solo ocupando un 0.02% de territorio en la Tierra, posee un 10% de plantas que existe en el planeta y además se ubica en el sexto lugar a nivel mundial en mega diversidad. (Ríos *et al*, 2008).

En los países andinos, la producción de especies y frutas nativas ha ido disminuyendo, en muchos casos llegando incluso a la desaparición en algunas zonas, y hasta la extinción (National Academic, 1989).

A nivel mundial y en el país se observa la erosión genética que se cierne por efecto de la deforestación, la desertificación, el crecimiento urbano y los cambios en los hábitos alimenticios, generadas estas causas se concienció sobre la necesidad de rescatar y conservar las diferentes categorías de recursos fitogenéticos, por lo cual se ejecutaron las primeras recolecciones, iniciándose la formación de colecciones parciales de germoplasma (Leipzig, 1996)

Entre los cultivos que fueron recolectados se encuentra el capulí, este árbol se encuentra a punto de desaparecer debido a que se ha visto amenazado por la mala utilización de los suelos donde sus huertas se han convertido en parqueaderos públicos, sus campos han sido talado para dar paso a los pastizales y sobre todo ha existido un descuido por parte de la sociedad y se lo está dejando desaparecer (Nicanor, 2012)

El capulí (*Prunus serótina ssp capuli*) ha ido decreciendo en cuanto a su población, productividad, rendimiento y calidad del producto, según Chisaguano (2012), manifiesta que en los últimos años la reducción de esta especie es del 57% en la población de árboles, los cuales ha disminuido en los últimos 7 años, causando la reducción y pérdida de estos ejemplares.

Entre los diversos usos se menciona que puede ser consumido directamente su fruto en estado fresco; elaborarse dulces y con su pulpa licores (Gavilanes, 1990), su madera es utilizado en ebanistería, es una especie que se utilizada para la reforestación ya que durante su desarrollo genera una gran cantidad de biomasa y tiene una buena adaptación en zonas secas, son usados también como cercos vivos o cortinas rompe vientos. En este sentido es un árbol excelente para las áreas urbanas puesto que generan un embellecimiento de parques (Spier, 1980), además de ser un árbol tolerante a la contaminación ambiental, soporta las heladas, viento, suelos ácidos, compactados, pedregosos y húmedos. Esta especie ha tenido usos medicinales desde tiempos prehispánicos, específicamente para enfermedades como diarrea e inflamaciones respiratorias asociadas con la tos, es probable que el uso del capulí en estas enfermedades se debe a la gran gama de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides, de los que se conoce sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su capacidad para remover oxígeno reactivo y radicales libres. Dos antocianinas ya reportadas en capulí son la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinosido (Jiménez et al. 2011), sus semillas son tóxicas, conteniendo de 30 a 40 % de aceite semi secante apropiado para la fabricación de jabones y pintura (Flores J. 2008).

Los fruticultores en los Andes deben investigar esta especie por su madera fina y calidades de combustible (leña), los árboles están desapareciendo de algunas áreas, con la pérdida consecuente de valioso germoplasma (National Academy 1989).

Ante esta problemática, se pretende establecer un protocolo de producción *in vitro* de capulí ya que se presenta como una alternativa viable que permite la producción de especies frutales siendo esta

económicamente rentable, frente a los métodos de multiplicación (sexual: germinación de semillas, y asexual: injerto) que no han dado buen resultado debido a que ocasiona una gran variabilidad genética, con frutos de diferente calidad de , la aplicación de un protocolo generará plantas elites de alta productividad y de gran valor comercial, que tienen inmenso potencial para ser utilizadas en sistemas agroforestales y programas de forestación y reforestación promovidos; además el cultivo de tejidos, connota familiarizarse con la biología y fisiología de la planta con la cual se trabaja, un cultivo aséptico de tejidos, células u órganos de vegetales implica el empleo de varias sustancias que permiten la desinfección del tejido y el aporte balanceado de nutrientes para su óptimo desarrollo (Pierik, 1997).

Estas técnicas de multiplicación se basan en el principio de la totipotencia celular propuesta por Haberlandt (1902) y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog *et al.*, (1957) para la reproducción celular de tejidos vegetales. Dichas técnicas han contribuido no solo a eventos que permiten entender la diferenciación de la célula, sino, al aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas, (Roca y Mroginski, 1993).

Mediante esta técnica se pueden obtener copias idénticas de una especie en un tiempo corto, generando un gran número de plántulas para su cultivo (Abdelnour y Escalant, 1994). Uno de los principales objetivos del cultivo de tejidos es la multiplicación masiva de plantas ya sean alimenticias, medicinales y forestales nativas de importancia ecológica o industrial; y se pone énfasis en la multiplicación de especies nativas que puedan mediante sus propiedades o características mejorar la producción agrícola, la alimentación o en la recuperación de ecosistemas intervenidos (Roca y Mroginski, 1993). Además, esta técnica permite producir plantas durante todo el año, independientemente del factor climático (temperatura, luz, humedad (Recalde, 2007).

En este trabajo se establecerá un protocolo que será utilizado para la multiplicación de capulí a partir de segmentos nodales, permitiendo su uso con fines de producción e investigación de este frutal, de acuerdo con el conocimiento actual sobre el tema, se plantearon los siguientes objetivos:

## **1. OBJETIVO**

### **1.1 General**

Evaluar medios de cultivo para la micropropagación in vitro de capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*), como alternativa para el rescate de esta especie.

### **1.2 Específicos**

- Identificar el método óptimo de desinfección para reducir la contaminación de los explantes de capulí.
- Establecer los medios de cultivo para la etapa de brotación y enraizamiento
- Determinar las diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina para la inducción a la brotación
- Examinar diferentes concentraciones de Ácido indol butírico para la inducción del enraizamiento
- Examinar las interacciones de los factores en estudio
- Calcular los costos de producción para la reproducción *in vitro* de Capulí

### 1.3 Hipótesis

**Ho:** Existe un protocolo para la micropropagación de capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) a partir de segmentos nodales para una producción masiva de plantas

**Ha:** No existe un protocolo para la micropropagación de capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*) a partir de segmentos nodales para la producción masiva de plantas

**Ho:** Las concentraciones de Hipoclorito de sodio presentan respuestas similares en la desinfección de los explantes de Capulí.

**Ha:** Las concentraciones de Hipoclorito de sodio presentan respuestas diferentes en la desinfección de los explantes de Capulí.

**Ho:** El tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio presentan respuestas similares en la desinfección de los explantes de Capulí.

**Ha:** El tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio presentan respuestas diferentes en la desinfección de explantes de Capulí.

**Ho:** Las concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) para estimular la brotación presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

**Ha:** Las concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) para estimular la brotación no presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

**Ho:** Las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para estimular el enraizamiento presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

**Ha:** Las concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) para estimular el enraizamiento no presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

**Ho:** Las interacciones entre el medio de cultivo y dosis (BAP, IBA) presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

**Ho:** Las interacciones entre el medio de cultivo y dosis (BAP, IBA) no presentan efectos similares en la micropropagación del Capulí.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen

El capulí es una especie arbórea originaria de Norte América, aunque también se la considera endémica de Ecuador, México y Perú (Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe y Pachano, 1922; Fresnedo-Ramirez, 2011). La distribución de esta especie en los Andes es muy amplia reportándose desde los 1800 a 3500 m.s.n.m. es una especie intolerante a la sombra, en la cual los árboles lucen cortos e inclusive algunos mueren (Auclair y Cottam, 1971).

### 2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La variedad de capulí que crece en países como el Ecuador recibió la denominación de “*Prunus serotina* subsp. *capulí* (Cav.)” por McVaugh (1951); ésta es la nomenclatura con la cual se la identifica en la actualidad y se encuentra clasificado de la siguiente manera.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Rosales
<b>Familia</b>	Rosaceae
<b>Subfamilia</b>	Prunoideae
<b>Género</b>	Prunus
<b>Subgénero</b>	Padus
<b>Especie</b>	P. serotina

**Nombre Científico** *Prunus serotina* ssp *capuli*.

### 2.3 Sinonimia de la especie

El nombre científico aceptado del capulí es *Prunus serotina* spp *capulí* Cav pero se ha encontrado con los siguientes sinónimos (CONABIO, 2012)

*Prunus capuli* Cav

*Prunus salicifolia* Kunth

*Prunus serotina* var. *salicifolia* (Kunth) Koehne

*Prunus capullin*

*Cerasus capollin* DC.

### 2.4 Nombre Vernacular

Al capulí se le conoce con los siguientes nombres: Cerezo negro (Estados Unidos), Cerezo criollo (Colombia), Guinda (Perú), Capulí chaucha (Ecuador – kichwa) y Capulí (Castellano)

### 2.5 Distribución Geográfica

Es una especie que se encuentra distribuida de lo largo del callejón interandino, en la región alrededor de Ambato, se dice que es una fuente buena de capulí de calidad (National academic, 1989).

(Sánchez y Viteri, 1981) manifiestan que es un espécimen ornamental típico de las provincias del callejón interandino. Prospera bien en Ecuador, particularmente en las provincias de Tungurahua, Chimborazo y en Cotopaxi (Gavilanes, 1990).

## **2.6 DESCRIPCION BOTÁNICA**

### **2.6.1 Árbol**

Es árbol o arbusto monopódico, con un fuste erguido y corto que puede medir de 5 a 15 m de altura (CONABIO, 2012), su corteza por lo general es de color café oscuro, en la epidermis en estado adulto tiende a presentar agrietamientos, sus ramas son alternas erguidas y muy extendidas formando una copa ovoide, su varia color dependiendo de la variedad, permitiéndole ser atractiva a la vista por sus toques brillantes (Sánchez, 1991)

### **2.6.2 Raíz**

La raíz se desarrolla rápidamente y de forma superficial; ésta se extiende a mediana profundidad y ocupa los primeros 60 cm del suelo (CONABIO, 2012).

### **2.6.3 Hojas**

Las hojas son alternas, lisas, lanceoladas estipuladas, pecioladas cortamente y ovadas su medida es de 5 a 16 cm de largo por 2 a 5 cm. de ancho, nervadura pinnatinervia que es visible en ambos lados de la hoja (Spier, 1980).

### **2.6.4 Flor**

(Spier, 1980), señala que posee flores dispuesta en racimos de color blanco con medidas de 10 a 15 cm de largo, tiene un cáliz gamosépalo de color verde claro, la corola presenta cinco pétalos de color blanco, los estambres blancos sobresalientes (10 estambres en el borde y 8 en el centro) con anteras amarillas, el ovario de la flor es libre y sésil, unilocular con dos óvulos, el estilo es simple con estigma peltado (Mille, 1942).

### **2.6.5 Fruto**

El fruto es una drupa globosa que se da en racimos delgados, cuando se encuentra maduro suele tener un color negro, con una cáscara delgada, la carne es jugosa y con un sabor entre dulce y amargo. En cuestión de tamaño se han encontrado frutos con diámetros de hasta 2,5 cm en la serranía ecuatoriana y sus sólidos solubles tiene un valor promedio de 19.31% que corresponde a un porcentaje muy alto (Popenoe y Pachano, 1922).

Los frutos de América del Norte son pequeños con un diámetro de entre 6 a 10 milímetros, poco carnosos y carecen de valor comercial; mientras que las variedades domesticadas en América Central y Sudamérica se caracterizan por producir frutos grandes con un diámetro de entre 2 a 3.5 centímetros, carnosos y de agradable sabor (Popenoe, 1924 y Popenoe & Pachano, 1922 ambos citados por Downey e Iezzoni, 2000).



### **2.6.6 Semilla**

El capulí presenta una semilla esférica por fruto y se encuentra rodeada por un endocarpio leñoso (almendra). Tienen alto poder germinativo casi del 100 % cuando se las ha sometido a algún tratamiento de escarificación ya sea mecánica o física (Camacho, 1985)

### **2.7 Distribución Ecológica**

Esta especie se produce bien en las formaciones ecológicas –sistema Holdridge– Estepa Espinosa Montano Bajo, en alturas de 1800 a 3100 m.s.n.m., florece hasta los 3400 m.s.n.m.; y en forma arbustiva (sin flores), hasta los 3900 m.s.n.m. Proporcionalmente a mayor altura, se reduce su tamaño y pierde la capacidad de producción de frutos (Gavilanes, 1990).

### **2.8 Importancia**

Las ventajas que presenta este árbol son las siguientes:

La bebida del cocimiento de sus hojas es diurética y expectorante, además las ramas pequeñas y los pecioloos junto con las hojas, son tóxicas para el ganado (Bartholomäus, *et, al* 2000?)

La corteza se usa contra las diarreas y la infusión de hojas tiene propiedades calmantes.

La semilla contiene un aceite utilizado en fabricación de jabón y pinturas (Ferfub, 1996?).

Las hojas en infusión se usan para casos de reumatismo, gripe, parto; a manera de emplasto sobre heridas, zonas afectadas de reumatismo, lesiones, fracturas y otros; en bebidas o brebajes para curar heridas, contrarrestar el reumatismo y los sarpullidos y se usa como protector climático. Las hojas sirven como abono de los suelos, en especial en los arreglos agro-forestales (CESA, 1992).

Tiene una madera útil, de crecimiento rápido y es una especie útil para la reforestación (se produce en las tierras pobres, el costo de producción también es baja).

Es una planta buena para protección del viento y actúa como una barrera biológica.

### **2.9 Valor nutritivo**

La importancia del capulí radica en su valor alimenticio, por contener calcio, hierro, aminoácidos, ácido ascórbico como lo expresa Burton. En el Cuadro 1 se presenta el contenido bromatológico del fruto del capulí.

**Cuadro 1.** Composición bromatológico del fruto de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*).

Nutrientes	Cantidad
Energía (kcal)	84
Proteína (g)	1.30
Grasa Total (g)	0.20
Colesterol (mg)	-
Glúcidos	21.70
Fibra (g)	1
Calcio (mg)	28
Hierro (mg)	1.20
Yodo (µg)	-
Vitamina A (mg)	15
Vitamina C (mg)	26
Vitamina D (µg)	-
Vitamina E (mg)	0
Vitam. B12 (µg)	-
Folato (µg)	0

Fuente: FUNIBER

## 2.10 Usos

Los usos más importantes se detallan a continuación:

### 2.10.1 Alimento

El capulí puede ser consumido directamente como fruto fresco de un sabor agradable; pueden también elaborarse dulces y con su pulpa, licores (Gavilanes, 1990).

El fruto es comestible se usa para preparar dulce con panela y coladas con duraznos llamadas “jucho” (Kichwa de la Sierra – Cotopaxi; etnia no especificada– Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Cañar, Azuay). y un tipo de licor destilado parecido al *Kirsch* o al *maraschino* (Popenoe & Pachano, 1922; Diario El Comercio, 2012; CONABIO, 2012).

### 2.10.2 Alimento de animales

Torre *et al.* (2008) mencionan que las hojas, ramas, corteza, semillas son venenosas para el ganado ya que contienen un glucósido cianogénico que se transforma en ácido hidrocianico durante la digestión.

### 2.10.3 Melífera

Posee un néctar valioso para la producción de miel de alta calidad, sus flores de la variedad glandulosa producen una miel excelente (CONABIO, 2012).

#### **2.10.4 Combustible**

Su madera es excelente para carbón de leña (CESA, 1992)

#### **2.10.5 Maderable**

La madera es conveniente para las asas de las herramientas, postes, leña y es excelente su color rojizo para las guitarras, mobiliario, ataúdes, y otros productos (CONABIO, 2012)

#### **2.10.6 Medicinal**

La flor en infusión y mezclada con flor de alfalfa, semillas de zapallo, mamey, y huesos de pescado, se bebe para acelerar las contracciones del parto (Kichwa de la Sierra – Tungurahua).

La infusión de las hojas se usa para tratar tumores. Las hojas jóvenes, machacadas y mezcladas con aceite de almendras y azúcar, se aplican calientes para aliviar el dolor de cabeza (Kichwa de la Sierra, etnia no especificada – Tungurahua) (Torres *et al.*, 2008).

Las hojas cocidas sirven como diurético y expectorante (Bartholomäus, *et al.*).

El polvo de la corteza aplicado en los ojos desvanece las nubes, aclara la vista y cura las inflamaciones. Los extractos, infusiones y jarabes preparados con las ramas, corteza y raíces, se usan como tónicos y sedantes en el tratamiento de la tisis pulmonar y en la debilidad nerviosa.

#### **2.10.7 Ambiental**

La belleza de su follaje sirve de ornato más común de las áreas verdes (Spier, 1980).

Es una especie apropiada para uso en cortinas rompe vientos para evitar la erosión de los suelos (Palacios, 2011; Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012) y para planes de reforestación y agroforestería.

##### **2.10.7.1 Efecto restaurador**

Esta planta se ha empleado para rehabilitar sitios donde hubo explotación minera. Es usado para reforestar suelos sódicos, reduciendo el pH de 9.5 a 7.9, aumentando la capacidad de retención de agua (CONABIO, 2012)

#### **2.11 Método de propagación**

##### **2.11.1 Reproducción Asexual.**

En este proceso se aplica el método de estacas, con amplia variación entre cada árbol en el enraizamiento; se hacen estacas de madera suave de plantas juveniles, con esto la especie tiene la capacidad de producir brotes o retoños (tocón), así mismo que producir rebrotes. Las estacas de 5 cm (con 2 nudos), sumergidas en un enraizador, a las 5 semanas tienen un 96 % de enraizamiento (Flores, 2008).

### 2.11.2 Reproducción Sexual.

La germinación del embrión ocurre al primero o segundo año en condiciones naturales, después de haber caído la semilla, hay ocasiones que demora la germinación, retardando su proceso hasta después de los 3 años. Este proceso se da por regeneración natural, en la que la apertura de claros, las plántulas contenidas en el banco de semillas se proliferan y se realiza la siembra directa (Flores, 2008).

### 2.12 Variedades

Las variedades de capulí que se distinguen son el delgado llamado “Común” y el grueso “Chaucha” (CESA, 1992). Las variedades clasificadas se determinan de acuerdo al tamaño y color de los frutos. Hay 4 variedades que son: Chaucha Colorado, Chaucha negro, Criollo Colorado, Criollo Negro; las mismas que serán detallados en la siguiente tabla (Sánchez *et al* 1981)

**Cuadro 2.** Característica de las variedades del fruto de capulí

Concepto	Diámetro polar cm.	Diámetro ecuatorial cm.	Sólidos solubles %	Color de la corteza Munsell	Color de la pulpa Munsell
<b>Variedades</b>					
<b>Chaucha Colorado</b>	1.80	2.27	16.36	41-14	22-9
<b>Chaucha Negro</b>	1.71	1.99	19.85	Negro	22-7
<b>Criollo Colorado</b>	1.36	1.59	18.31	36-14	23-8
<b>Criollo Negro</b>	1.36	1.58	22.70	Negro	23-10
<b>Media</b>	1.56	1.83	19.31		

Fuente: Sánchez y Viteri 1981

### 2.13 La micropropagación

La propagación de plantas, ha tenido amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*, (Villegas, 1998). La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura.

Roca y Mroginski, (1993) menciona que se aplica en la producción masiva de plantas cultivadas *in vitro* conservando las características fenotípicas y genotípicas de la planta original de la que se derriba especies hortícolas, frutícolas, ornamentales y forestales, (Smith, 2000).

La micropropagación por brotes axilares puede hacerse utilizando ápices del tallo o nudos con una o varias yemas axilares. Los ápices que se usan son de dos centímetros de largo y los nudos pueden ser de ápices terminales o laterales con parte del tallo incorporado. El uso de explantes más grandes es deseable ya que son más fáciles de disectar y tienen una mayor posibilidad de sobrevivir y crecer que explantes pequeños. Pero, por otro lado a mayor largo del explante es más difícil la descontaminación en algunas especies de plantas.

La ventaja de este método de propagación frente al método de propagación tradicional es la estabilidad genética que se muestran los individuos obtenidos ya que las plantas regeneradas provienen de una multiplicación clonal (Orozco, 1996).

## **2.14 Etapas del cultivo *in vitro***

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro*, se pueden distinguir las siguientes etapas: selección y preparación de la planta y/o tejido donante de explantes, desinfección y adaptación de los explantes al medio artificial, multiplicación de brotes, enraizamiento y rusticación. Se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado para lo cual es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero, en el que se va a cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de nutrición, fotoperíodo e irradiancia adecuadas, (Orellana, 1998).

### **2.14.1 Etapa 0. Selección y preparación de la planta**

Para iniciar un cultivo *in vitro* el primer paso es la elección de un explante apropiado para el establecimiento del cultivo; dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Aunque se puede utilizar cualquier tipo de material vegetal, en general resulta más conveniente utilizar los órganos, tejidos o células de plantas jóvenes que los de plantas adultas ya que se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis; ya que, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar (brotes apicales de yemas en desarrollo), mejor será la respuesta *in vitro*, (Sabja *et al.*, 2008).

### **2.14.2 Etapa 1. Desinfección y adaptación (establecimiento) de los explantes al medio artificial**

Una vez seleccionada la planta madre en condiciones de asepsia, se extraen los explantes del material vegetal para ser desinfectados y ubicados en un medio de cultivo de iniciación, (Pierik, 1987).

La desinfección de explantes es el paso primordial para el establecimiento *in vitro* de cualquier especie vegetal, pues el material a introducirse puede contener microorganismos perjudiciales como son las bacterias y los hongos los cuales ocasionan la degeneración o muerte del explante, agotan los nutrientes del medio de cultivo y excretan sustancias tóxicas que impiden el desarrollo normal de los explantes. Es necesario trabajar en lugares adecuados, para asegurar un medio ambiente aséptico la siembra de explantes se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, (Fontúrbel 2004; citado por Navarro, 2005) menciona que, también se debe esterilizar los medios de cultivo y utensilios con los que se va a trabajar, (Roca y Mroginski, 1993).

El procedimiento para la desinfección superficial debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes, no es factible recomendar un procedimiento general para este propósito y se debe considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante; el tamaño aparentemente no tiene influencia salvo el caso de que se quiera obtener plantas libres de virus para lo cual se parte de meristemas; sin embargo, es más difícil regenerar plantas completas de ellos.

La mayoría de los contaminantes de la superficie del tejido vegetal utilizado, pueden ser eliminados con un agente esterilizador apropiado bajo condiciones asépticas, la solución esterilizadora normalmente se aplica por tiempos determinados según el tipo de explante, ésta es eliminada y el material vegetal lavado por agitación en agua destilada estéril 3 a 4 veces durante 5 minutos cada vez, (Roca y Mroginski, 1993).

Durante el proceso de desinfección se debe precautelar la integridad del explantes a fin de evitar la oxidación y necrosamiento del material vegetal, ya que al emplear concentraciones altas de hipoclorito de sodio se ve afectado la viabilidad del explante.

No es posible establecer un mismo protocolo de desinfección para cualquier explante de cualquier especie, debido a que el mismo debe estar diseñado en función de varios factores (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El lavado es muy importante para eliminar el exceso del agente esterilizador, que puede inhibir el crecimiento de la planta, (Sunshine, 2008).

### **2.14.3 Etapa 2. Multiplicación de brotes**

En esta etapa la condición nutricional y hormonal del medio de cultivo sirve básicamente en la ruptura del reposo de la yema axilar, promoviendo su rápido desarrollo. Durante esta fase se espera que los explantes originen brotes con varios entrenudos los mismos que deben subcultivarse en un nuevo medio de cultivo, (Rodríguez, 2006).

### **2.14.4 Etapa 3. Enraizamiento**

Para el enraizamiento de los explantes se utilizan los siguientes métodos:

#### **2.14.4.1 Enraizamiento *in vitro***

Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Esta operación se realiza en la cámara de flujo laminar. Este método permite ser más flexible a la hora de escoger los brotes, ya que éstos obtienen del medio la fuente de energía para enraizar, y por tanto no es necesario que tengan las hojas muy bien desarrolladas para realizar la fotosíntesis, (Pierik, 1987).

#### **2.14.4.2 Enraizamiento *ex vitro***

Los explantes obtenidos *in vitro* se deben transferir a un sustrato, que generalmente puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita; con este método es necesario que el medio de enraizamiento esté libre de organismos patógenos y que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse. Los explantes deben plantarse en cámaras plásticas, para mantener la humedad relativa elevada, y hacerlos enraizar en un cuarto de cultivo, (Pierik, 1987).

### **2.14.5 Etapa 4. Aclimatación**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. Tanto si los explantes fueron enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas perezosos para responder al descenso de la humedad relativa, demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, que evita la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta, (Pierik, 1987).

## **2.15 Medios de cultivo**

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos, (Mroginski *et al* 2010). Los componentes necesarios para la preparación de los medios nutritivos son agua, fuentes de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, sustancias reguladoras de crecimiento y agentes gelificantes.

### **2.15.1 Carbohidratos**

Se emplea en varios casos sacarosa, aunque depende de la especie a utilizarse en la investigación. Esta se emplea porque los explantes no presentan la característica de ser autótrofos y además para cubrir las necesidades fotosintéticas de la planta (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

El azúcar es un componente importante del medio de cultivo, ya que es esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*. Los tejidos verdes que poseen las plántulas en desarrollo no son lo suficientemente autótrofos en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario suplementar el medio de cultivo en una concentración que varía de 1 a 5% de sacarosa (disacárido). La elección de la concentración de azúcar dependerá del tipo y edad de crecimiento del material vegetal, generalmente el crecimiento y desarrollo de las plántulas requiere de un incremento de la concentración de azúcar, pero en concentraciones elevadas de azúcar se ha evidenciado un decrecimiento del explante (Pierik. R.L.M., 1997).

### **2.15.2 Nutrientes Minerales**

Los medios actuales en relación con los primeros propuestos aportan varias mejoras, como lo es el aumento de las concentraciones de KNO en el medio, introducción de N en la forma NH<sub>3</sub> (amonio). Estas mejoras permiten un mejor crecimiento de callos pero también la formación de órganos. Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento (Kajin, 1996).

Los micronutrientes son esenciales y se encuentran en bajas concentraciones en las plantas, la mayoría de ellos corresponden a constituyentes enzimáticos, por eso es necesario la presencia de los mismos pero en concentraciones bajas. Los macronutrientes son elementos constituyentes de biomoléculas estructurales, como es el caso de proteínas, lípidos o carbohidratos, o en algunos casos actúan como osmolitos (Roca, W. Mroginski, M. 1993).

## **2.16 Fitohormonas**

Las hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. La composición y concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo son factores determinantes para el normal crecimiento y desarrollo de la mayoría de plantas en los sistemas de cultivo *in vitro*, (Guidolin, 2003).

El uso de fitoreguladores y los requerimientos varían considerablemente de acuerdo al tipo de tejido y a los niveles endógenos de reguladores, los reguladores más críticos son las auxinas y citoquininas, los mismos que intervienen en la elongación y división celular respectivamente, así

como la formación de brotes y raíces o las giberelinas en la germinación de semillas (Suárez de Castro, 1993)

Saavedra (2008), menciona que existen cinco grupos principales de hormonas y reguladores de crecimiento que ocurren en forma natural; y se detallan a continuación:

### **2.16.1 Auxinas.**

El nombre auxina significa en griego "crecer" (Biocity, 2003) es el término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células (Altamirano *et al* 1993). Las auxinas se encuentran en toda la planta las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas siendo este el sitio de síntesis en crecimiento activo y se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas (Biocity, 2003). La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos. (Biocity, 2003, Kyle *et al*, 1996).

### **2.16.2 Citoquininas.**

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo debido al uso anterior del hombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adopta el término citoquinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos en la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo ambos sufriendo una rápida división celular. La citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles (Biocity, 2003).

### **2.16.3 Giberelinas.**

Estas hormonas son un producto metabólico del hongo *Giberella fujikuroi*, no muestran el mismo transporte fuertemente polarizado como las auxinas, aunque en algunas especies presenta un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis), incrementan el crecimiento de los tallos, interrumpe el período de latencia de las semillas e inducen la producción de yemas y el desarrollo de los frutos, (Salisbury y Ross, 2000).

Existen multitud de giberelinas conocidas, la de mayor uso es el GA3 pero debe tener en cuenta que son termolábiles (sensibles al calor), ya que se pierde el 90% de su actividad después del autoclaveado. Comparado con las auxinas y citoquininas las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales. El GA 3 es soluble en agua fría hasta 1000 mg l<sup>-1</sup> (15) y sus efectos son debidos a la estimulación de enzimas específicas o a cambios en la disponibilidad endógena de auxina (Pierik, 1990).

## **2.17 Vitaminas**

Las vitaminas favorecen al desarrollo de cultivos *in vitro* y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B6), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en



algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina.

Smith (2000), detalla las funciones específicas de algunas vitaminas:

La Tiamina (B1), es un componente esencial de las coenzimas que catalizan la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Sin esta vitamina las células no pueden realizar sus funciones vitales.

La Riboflavina (B2), es necesaria para el crecimiento de las raíces y funciona reduciendo la cantidad de auxina del sistema radicular. Una gran cantidad de esta hormona inhibe el crecimiento de la raíz.

La Niacina (B12), desempeña un papel importante en la respiración porque es un componente de las coenzimas I y II, que son grupos portadores de hidrógeno en la fase respiratoria de deshidrogenación.

El ácido ascórbico (vitamina C), interviene en los sistemas de oxidación de la célula y establece potenciales favorables de oxidación - reducción. Se emplea para reducir la producción de fenoles *in vitro* o en la superficie de frutos recién cortados.

Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el mio-inositol, que está involucrado con el crecimiento y la morfogénesis, especialmente cuando va combinado con vitaminas, participa en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. En general se utiliza en una concentración 0,5 mM (Pierik, 1990).

## **2.18 pH del medio de cultivo**

El pH cuando se prepara un medio de cultivo después de añadir todos sus componentes se procede a ajustar al valor deseado añadiendo NaOH al 0.1 N ó HCl al 0.1 N al medio. A valores bajos inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos, este valor puede afectar a algunos de los componentes del medio de cultivo y por ende a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante.

Razones por la cual conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8 (Closal y Cueva, 1998).

## **2.19 Agentes gelificante**

Los medios de cultivo pueden ser sólidos, semisólidos y líquidos según la concentración del agente gelificante, entre las sustancias más utilizadas se encuentra el agar, es un polisacárido obtenido de la purificación de las algas marinas rojas, que contiene dos componentes agarosa y agarpectina. Cuando es mezclado con un líquido forma un gel que se mezcla a una temperatura de 100°C y se solidifica a una temperatura de 45 °C, al solidificar el medio y forma un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. El agar presenta algunos inconvenientes; el principal consiste en ofrecer una aireación insuficiente que puede afectar el crecimiento de algunos tejidos (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

La concentración óptima de agar es variable con el origen comercial del agar utilizado y el objetivo del cultivo. Las concentraciones más utilizadas varían entre 6 – 10 g/L. La pureza del agar también

es otro factor muy importante, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variable, la marca comercial y las concentraciones de agar utilizado pueden alterar las respuestas *in vitro* de los cultivos (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

Otros productos gelificantes son el gelrite y phytigel; el primero es un heteropolisacárido aniónico natural producido por una bacteria, que forma geles semejantes al agar, se puede usar a una concentración de 0.15 – 0.40%. Estos geles son más caros que el agar y también cuajan más rápidamente, sin embargo causan vitrificación en algunas especies (Suárez de Castro, 1993). También pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfergel» (2,0-2,60%), y Agarosa (0,80-0.90%).

## **2.20 Cultivo *in vitro***

La propagación vegetativa ha tenido un papel importante en la multiplicación de árboles elite (Ivanova, 1981); sin embargo, se ha observado que las estacas pierden la capacidad para enraizar a medida que el árbol de origen es más viejo. Por otro lado, es necesario que los árboles usados como patrones sean lo suficientemente maduros para que expresen su potencial genético; asimismo, al emplear ramas maduras para el enraizamiento hay problemas de crecimiento plagiotrópico (Sweet, 1973).

La micropropagación *in vitro* de plantas, es una de las herramientas que permite propagar árboles seleccionados por sus características fenotípicas o con fines de conservación, de especies en peligro de extinción a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Esta técnica permite incrementar la tasa de multiplicación que por la vía sexual difícilmente se pueden alcanzar (Echenique et al., 2004).

Otras de las ventajas de la micropropagación, es que puede mantener un alto margen de sanidad y estabilidad genética del material propagado por esta vía, sin importar las condiciones ambientales y en espacios más reducidos, manteniendo un flujo constante de material vegetativo durante todo el año, de esta forma no se entorpecen los programas de reforestación con fines comerciales o de protección (Echenique et al., 2004; Roca & Mroginski, 1991).

La propagación de plantas *in vitro* es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Echenique et al., 2004).

Las células somáticas de cualquier tejido al tener la propiedad de la totipotencia pueden formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban. Esta regeneración ocurre en fases consecutivas: la fase de desdiferenciación, donde las células se vuelven competentes para responder ante cualquier estímulo organogénico o embriogénico; la fase de inducción, donde las células se determinan para formar un órgano o embrión, y la fase de realización, donde se forma el órgano o embrión propiamente dicho. Estas fases están directamente afectadas por el balance hormonal del medio de cultivo, por lo cual la optimización de los protocolos de regeneración debe realizarse teniendo en cuenta los requerimientos intrínsecos de cada genotipo en cada fase del cultivo (Echenique et al., 2004)

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Ubicación del ensayo**

###### **3.1.1.1. Ubicación política y geográfica**

La investigación se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador (FCA-UCE), en el Campus Universitario de Quito, cuya ubicación es la siguiente:

###### **3.1.1.1.1 Ubicación política**

**Provincia:** Pichincha  
**Cantón:** Quito  
**Parroquia:** Santa Prisca

###### **3.1.1.1.2 Ubicación geográfica**

**Latitud:** 00° 11' 92" Sur  
**Longitud:** 78° 30' 41" Oeste  
**Altitud:** 2 874 msnm

##### **3.1.2 Características del cuarto de cultivo**

La mayor parte del trabajo se realizó bajo condiciones de laboratorio a excepción de las siembras y repiques que se realizarán en cámara de flujo laminar, los ensayos permanecerán en el cuarto de cultivo con condiciones de crecimiento controladas

**Temperatura promedio:** 26 °C  
**Humedad relativa:** 60 %  
**Intensidad luminosa:** 4 Kilolux  
**Fotoperiodo:** 16

##### **3.1.3 Ubicación geográfica de la zona de recolección**

La recolección de explantes se realizó en los barrios “3 de Mayo” y “El Cardón” localizado en el Cantón Pujilí, Provincia de Cotopaxi, a 2961 metros sobre el nivel mar con un promedio de temperatura de 15 °C, con una latitud 00° 55' 53.54" Sur y con una longitud 78° 39' 17.07" Oeste.

##### **3.1.4 Material vegetal**

###### **3.1.4.1 Explantes**

El material vegetal se obtuvo a partir de plantas madres que consistió en esquejes (explantes) de capulí chaucha, estos fueron deshojados y cortados hasta obtener segmentos nodales de tres centímetros aproximadamente y con un par de yemas, el material fue colectado en los Barrios El Cardón y la Victoria pertenecientes al Cantón de Latacunga provincia de Cotopaxi. Las plantas madres tienen una edad aproximada de 15 años, presentan buenas condiciones fitosanitarias.

### 3.1.2 Materiales de laboratorio

#### 3.1.2.1

##### Cristalería

- ✓ Frascos conserveros de 250 ml
- ✓ Botellas de vidrio de 500 ml
- ✓ Matraces (100 y 500 ml)
- ✓ Probeta (50, 500, 100ml)
- ✓ vasos de precipitación (1000 ml)
- ✓ Varilla de agitación
- ✓ Cajas de vidrio petri
- ✓ Embudos

##### 3.1.2.2 Reactivos

- ✓ Sales Murashige y Skoog, Chu  
adicionado con:
- ✓ Ácido bórico
- ✓ Nitrato de calcio
- ✓ Sulfato de magnesio
- ✓ Sulfato de manganeso.
- ✓ Cloruro de potasio
- ✓ Ioduro de potasio
- ✓ Nitrato de potasio
- ✓ Fosfato de sodio
- ✓ Sulfato de sodio
- ✓ Sulfato de zinc
- ✓ Sulfato férrico
- ✓ Myoinositol
- ✓ (IBA) Ácido indol butírico
- ✓ (BAP) N6 - Bencil Adenino purina
- ✓ Nitrato de amonio
- ✓ Cloruro de calcio
- ✓ Sulfato cúprico
- ✓ Fosfato de potasio
- ✓ Molibdato de sodio
- ✓ Tiamina
- ✓ Ácido nicotínico
- ✓ Piridoxina
- ✓ Glicina
- ✓ Azúcar
- ✓ Agar

- ✓ Alcohol potable
- ✓ Agua destilada
- ✓ Ácido cítrico
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Alcohol potable al 96 %
- ✓ Alcohol etílico anhidro
- ✓ Hipoclorito de sodio
- ✓ Hidróxido de sodio

##### 3.1.2.3 Equipos y materiales

- ✓ Agitador magnético y orbital
- ✓ Autoclave
- ✓ Balanza de precisión
- ✓ Bandejas plásticas
- ✓ Calefactor
- ✓ Cámara de flujo laminar
- ✓ Cámara fotográfica
- ✓ Canastillas plásticas
- ✓ Cuarto frío
- ✓ Destilador de agua
- ✓ Estufa
- ✓ Fundas de polietileno
- ✓ Mascarilla desechables
- ✓ Hojas de bisturí
- ✓ Horno de microondas
- ✓ Computadora
- ✓ Impresora
- ✓ Mango para bisturí #4
- ✓ Mechero de Bunsen
- ✓ Micropipetas (1000ul, 5000ul)
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Papel filtro
- ✓ Pinzas
- ✓ Picetas
- ✓ Potenciómetro
- ✓ Puntas para micropipetasprobetas
- ✓ Rollopack
- ✓ Servilletas de papel
- ✓ Termómetro ambiental

## 3.2 Métodos

### 3.2.1. Factores en estudio

Los factores para la investigación fueron concentración de hipoclorito de sodio (NaClO) y tiempo de inmersión (T) para la primera fase y medios de cultivo (M), dosis de 6 –bencilaminopurina (BAP), dosis de ácido indolbutírico (IBA) para la segunda y tercera fase, cada una descrita a continuación:

#### 3.2.1.1. Primera fase: Establecimiento de los explantes

El material vegetal obtenido, se trasladó al laboratorio donde se clasificó y separó para realizar la desinfección, para la obtención de segmentos nodales en donde fue removida las hojas. A continuación se utilizó medios de cultivo para inducir el material vegetal, cuyos componentes utilizados se detallan en el Anexo 1, en lo que se refiere a la desinfección del material se estableció tiempos y concentraciones utilizadas en el proceso, creando un adecuado establecimiento de explantes de capulí *in vitro* libres de patógenos (hongos y bacterias). El tiempo adecuado y las concentraciones del desinfectante utilizado en el proceso de desinfección se encuentran en el cuadro 2 y 3 respectivamente.

##### 3.2.1.1.1. Concentración de Hipoclorito de sodio NaClO (C)

Se procedió a la desinfección de los segmentos con la variación en la concentración del hipoclorito de sodio, el fin es eliminar tanto patógenos endógenos como exógenos presentes en el material, las concentraciones se muestra en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Concentración de Hipoclorito de sodio evaluado para la desinfección de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	NaClO
c1	NaClO al 10%
c2	NaClO al 15%
c3	NaClO al 20%

##### 3.2.1.1.2. Tiempo de inmersión (T)

El tiempo de inmersión depende de la cantidad y edad fisiológica del explante, tal como se muestra en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Tiempo de inmersión evaluado para la desinfección de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Tiempo
t1	5 minutos
t2	10 minutos

### 3.2.1.2. Segunda fase: Brotación de yemas apicales

Para la etapa de brotación se partió desde la desinfección de los segmentos repitiendo todo el proceso anterior, para esto se aplicó el mejor método obtenido en la etapa de establecimiento. Los segmentos desinfectados fueron sembrados en dos medios de cultivo en los cuales se adicionaron citoquininas, tal como se muestra en el cuadro 5 y 6 respectivamente.

#### 3.2.1.2.1. Medios de Cultivo (M)

Se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog –MS1/2- (1962) a la mitad de la concentración de sales y el medio Chu -N6- (1975) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Medios de cultivo evaluados para la brotación de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

Código	Medios de Cultivo
m1	Murashige y Skoog (MS ½)
m2	Chu (N6)

#### 3.2.1.2.2. Niveles de BAP (B)

Cárdenas (1992), sugiere la adición de 2.2 o 4.4 microM de Benciladenina (BA), para la brotación de yemas axilares de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Ehrh*); de allí que, para la investigación no se planteó los mismos niveles sugeridos por el autor mencionado, ya que en ensayos preliminares se empleó en los medios de cultivo desde 0.1 hasta 1.5 ppm de BAP, esta última dosis indujeron a la aparición tardía de las yemas axilares, resultando ser dosis elevadas por mostrar tal efecto, sin obtener resultados para la toma de datos. Por lo mencionado las dosis de BAP se redujeron estableciéndose así diferentes niveles de BAP, tal como se muestra en el Cuadro 6

**Cuadro 6.** Niveles de Bencilaminopurina (BAP) evaluados para la brotación de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

Código	Dosis (ppm)
b0	0.0
b1	0.3
b2	0.6
b3	0.9

#### 3.2.1.2.3. Tratamientos

Resulta de la interacción de los medios de cultivos (M) y de los niveles de 6-Bencilaminopurina (BAP), tal como se detalla en el Cuadro 7

**Cuadro 7.** Tratamientos para la inducción a la brotación de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Tratamientos	Codificación	Descripción
t1	m1 b0	Murashige&Skoog (MS1/2), 0.0 ppm BAP
t2	m1 b1	Murashige&Skoog (MS 1/2), 0.3 ppm BAP
t3	m1 b2	Murashige&Skoog (MS 1/2), 0.6 ppm BAP
t4	m1 b3	Murashige&Skoog (MS 1/2), 0.9 ppm BAP
t5	m2 b0	N6, 0.0 ppm BAP
t6	m2 b1	N6, 0.3 ppm BAP
t7	m2 b2	N6, 0.6 ppm BAP
t8	m2 b3	N6, 0.9 ppm BAP

### 3.2.1.3. Tercera fase: Enraizamiento

La etapa final de la investigación fue el enraizamiento en donde cada brote obtenido en cada fase generó una nueva plántula, éstas fueron sembradas en dos medios de cultivo a los que se adicionó auxinas a diferentes concentraciones, tal como se detalla en el cuadro 8 y 9 respectivamente.

#### 3.2.1.3.1. Medios de Cultivo (M)

Se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog –MS1/2- (1962) a la mitad de la concentración de sales y el medio para plantas leñosas propuesto por Lloyd y McCown (1981) Woody Plant Medium a la mitad de las concentraciones de sus sales -WPM<sup>1</sup>/2- (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Medios de cultivo evaluados para el enraizamiento de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

Código	Medios de Cultivo
m1	Murashige y Skoog (MS ½)
m2	Woody Plant Medium (WPM <sup>1</sup> /2)

#### 3.2.1.3.2. Niveles de IBA (I)

Cárdenas (1992) sugiere la adición de 9.8 microM de Ácido indol butírico (IBA), para la inducción de raíces de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Ehrh*); de allí que, para la investigación no se planteó los mismos niveles sugeridos por el autor mencionado. Por lo mencionado las dosis de IBA se aumento estableciéndose así diferentes niveles de IBA, como se detalla en el cuadro 9.

**Cuadro 9.** Niveles de Ácido Indol Butírico (IBA) evaluados para el enraizamiento de yemas apicales de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Dosis (ppm)
i0	0
i1	1
i2	2
i3	3

### 3.2.1.3.3. Tratamientos

Resulta de la interacción de los medios de cultivos (M) y de los niveles del Ácido indol butírico (IBA), tal como se muestra en el Cuadro 10.

**Cuadro 10.** Tratamientos para inducir el enraizamiento de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Tratamientos	Codificación	Descripción
t1	m1 i0	Murashige&Skoog (MS1/2), 0.0 ppm IBA
t2	m1 i1	Murashige&Skoog (MS 1/2), 0.5 ppm IBA
t3	m1 i2	Murashige&Skoog (MS 1/2), 1.0 ppm IBA
t4	m1 i3	Murashige&Skoog (MS 1/2), 1.5 ppm IBA
t5	m2 i0	Woody Plant Medium WPM 1/2, 0.0 ppm IBA
t6	m2 i1	Woody Plant Medium WPM 1/2, 0.5 ppm IBA
t7	m2 i2	Woody Plant Medium WPM 1/2, 1.0 ppm IBA
t8	m2 i3	Woody Plant Medium WPM 1/2, 1.5 ppm IBA

### 3.2.2 Unidad experimental: Primera, Segunda y Tercera fase

La unidad experimental será un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, que contendrá 30 ml de medio de cultivo y un explante por frasco.

#### 3.2.2.1 Análisis estadístico: Primera, Segunda y Tercera fase

##### 3.2.2.1.1 Diseño Experimental

Para el análisis estadístico de los datos se empleara la prueba del chi cuadrado para la primera fase y un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 2 x 4 para la segunda y tercera fase.

##### 3.2.2.1.2 Número de Observaciones

El número de observaciones por tratamiento fue de seis para la segunda y tercera fase.

##### 3.2.2.1.3 Análisis de la Varianza

El esquema del análisis de la varianza (ADEVA) para las fases de brotación e inducción de raíces se presenta en los cuadros 11 y 12 respectivamente.



**Cuadro 11.** Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de medios de cultivo para la inducción a la brotación de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Fuentes de Variación	GL
Total	47
Tratamientos	7
Medios de Cultivo (M)	1
BAP (B)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x I	3
Error Experimental	40

Promedio: unidades
C.V: %

**Cuadro 12.** Esquema del análisis de la varianza para la evaluación de medios de cultivo para la inducción de enraizamiento de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014.

Fuentes de Variación	GL
Total	47
Tratamientos	7
Medios de Cultivo (M)	1
IBA (I)	3
Lineal	1
Cuadrático	1
Cúbico	1
M x I	3
Error Experimental	40

Promedio: unidades
C.V: %

### 3.2.2.2 Análisis Funcional

Para el análisis funcional se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) al 5% para los Medios de Cultivo (M), y la prueba de Tukey al 5 % para niveles de BAP (B) e IBA (I) y para las interacciones (MXB), al detectarse diferencias estadísticas en el ADEVA.

### 3.2.2.3 Ajuste de datos

Posterior al análisis de la variancia se utilizó la prueba de Kolmogorov, para determinar si los datos se ajustan a la distribución normal y la prueba de Levene para determinar la homogeneidad de varianzas para el caso de los datos que no se ajusten se utilizó la transformación de  $\sqrt{x}$ , en el programa estadístico SPSS e InfoStat.

### **3.2.3. Variables y métodos de evaluación**

#### **3.2.3.1 Primera fase: Establecimiento de los explantes**

##### **3.2.3.1.1 Porcentaje de Contaminación**

Los datos se tomarón a los 15 días luego de la siembra en el cual se determinó mediante la observación de la presencia de hongos y bacterias, asignando un valor de 0 al explante no contaminado, y al explante contaminado con un valor de 1. La variable se expresó en porcentaje.

##### **3.2.3.1.2. Porcentaje de Viabilidad**

Se registró a los 30 días luego de haberse sembrado, en la que se observó la presencia de tejido viable y necrosado del explante, para lo cual se asignó un valor de 0 si el tejido es viable, y al explante necrosado un valor de 1. La variable se expresó en porcentaje.

#### **3.2.3.2 Segunda fase: Brotación de yemas apicales**

##### **3.2.3.2.1 Días a la formación de brotes**

Establecido el mejor protocolo de desinfección se procede a la inducción a la formación de brotes, para esto se cuantificó los días transcurridos desde la siembra hasta la aparición del brote en el explante, mediante observación diaria, la variable se expresó en número de días.

##### **3.2.3.2.2 Número de yemas formadas**

Se contabilizó las yemas presentes a los treinta días de los brotes de cada explante. La variable se expresó en número de yemas formadas.

##### **3.2.3.2.3 Altura de plántulas**

La longitud de las yemas se midió a los treinta días después de la siembra y se determinó desde la base hasta el ápice vegetativo. El resultado de la variable se expresó en centímetros (cm).

#### **3.2.3.3 Tercera fase: Enraizamiento**

##### **3.2.3.3.1 Porcentaje de explantes enraizados**

El procedimiento se llevó a cabo utilizando el material proveniente de la fase anterior, el resultado de la variable se expresó en porcentaje (%).

##### **3.2.3.3.2 Longitud de raíces**

Se midió con el papel milimetrado la longitud de la raíz más prominente, desde el cuello del tallo hasta el ápice radicular, el resultado de la variable se expresó en milímetros (mm).

##### **3.2.3.3.3 Número de raíces**

Se cuantificó el número de raíces obtenidas al final de la etapa de enraizamiento, el resultado de la variable se expresó en número de raíces.

#### **3.2.3.4 Análisis financiero**

Se realizó el costo de producción de cada fase hasta el enraizamiento de las vitroplantas, en la cual se tomará de acuerdo al que presente mejores resultados.

### **3.2.4. Métodos de Manejo del Experimento**

#### **3.2.4.1 Recolección del material vegetal**

Se colectó ramillas apicales de capulí chaucha en el sector del Cardón, San Alfonso y la Victoria pertenecientes a la Provincia de Cotopaxi, de los cuales se selecciono a los árboles vigorosos y representativos de la zona, que no presenten síntomas de enfermedades ni ataque de insectos, posteriormente se le coloco el material en fundas de ziploc para evitar daños al momento de transportarlos.

#### **3.2.4.2 Corte del material vegetal**

En el laboratorio se procedió a eliminar las hojas de las ramillas, para obtener segmentos nodales (porción de tallo que presenta una o varias yemas) dejando una porción de peciolo, estos segmentos fueron puestos en agua potable.

#### **3.2.4.3 Lavado y desinfección del material vegetal**

##### **Pre desinfección del material vegetal**

Se procedió al lavado y desinfección de los segmentos nodales de capulí, el lavado de los segmentos se realizó con abundante agua potable durante dos minutos, luego se preparó la disolución de Savlón (Clorhexidina 1.5% - Cetrimide 15%) más Povidyn (Yodo povidona solución u.s.p 10% y 1% de yodo disponible) para lo cual se tomó 10 ml de alícuota de cada producto, esta solución fue depositado en un vaso de precipitación en que se agregó tres veces el volumen de agua desionizada en relación a la cantidad de explantes (70 explantes), donde se mantuvo inmersos por cinco minutos con agitación constante, cumplido el tiempo se realizó tres lavados con agua desionizada. Luego se añadió 14 g de detergente comercial (2 cucharadas) al vaso de precipitación que contiene los explantes y se mantuvo en agitación constante durante 10 minutos, cumplido el tiempo de inmersión de los explantes en la solución con detergente, se realizó tres lavados sucesivos con agua desionizada, finalmente se colocó a los explantes en una solución de Benopac (Benomil) más Amistar Top (Azoxistrobina 20 % p/v y Difenconazol 12,5 % p/v ) una cantidad de 1.00g de cada producto durante 15 minutos en inmersión y con agitación constante, una vez terminado el tiempo se procedió a realizar tres lavados con agua desionizada cada uno de un minuto, y finalmente se llevó a los explantes a la cámara de flujo laminar para iniciar con el proceso de desinfección.

##### **Desinfección del material vegetal**

La desinfección consistió en sumergir los segmentos en etanol absoluto anhidro al 70% durante 30 segundos, luego se enjuagó tres veces con agua desionizada por un minuto, posteriormente se cubrió la superficie de los segmentos con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % de su concentración agitando durante cinco minutos y se enjuagó tres veces con agua desionizada esterilizada para eliminar los residuos de cloro.

### **3.2.4.4. Preparación de medios de cultivo**

#### **3.2.4.4.1 Preparación de MS al 50 % de su concentración:**

En un vaso de precipitación de 1000 ml de capacidad se colocó 200 ml de agua destilada, con una micropipeta de 5 ml se añadió los volúmenes correspondientes de las sales minerales clasificadas por Stocks I, II, III, IV, V a la mitad de las concentraciones y vitaminas, se agregó 30 g sacarosa, 0.1 g de mioinositol y se agitó, a esta solución se aforó a 1000 ml, se la dividió en cuatro alícuotas de 250 ml, donde se adicionó la hormona vegetal y 0,20 g de carbón activado a cada alícuota. Se ajustó el pH a 5.8 añadiendo gotas de NaOH y HCl a 0.1 N. Se calentó cada una de las soluciones en un horno microondas por 2 minutos para añadir y disolver el agar, se calentó nuevamente las soluciones durante 10 minutos aproximadamente hasta la ebullición. El medio caliente se dispense en los frascos rotulados, los cuales se taparon con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, a una presión de 15 psi (libras por pulgada cuadrada) durante 20 minutos.

#### **3.2.4.4.2 Preparación de N6 al 50% de su concentración:**

La preparación para el Medio N6 es similar a la preparación del medio MS al 50 % de su la concentración basal, manteniendo la concentración sugerida por el autor. Se dividió cuatro alícuotas donde se adicionó la hormona vegetales y 0,2 g de carbón activo a cada alícuota. Se ajustó el pH a 5.7 añadiendo gotas de NaOH y HCl 0.1 N. La solución caliente se distribuyó en los frascos debidamente rotulados, los cuales se taparon con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, a una presión de 15 psi (libras por pulgada cuadrada) durante 20 minutos.

#### **3.2.4.4.3 Preparación de WPM al 50 % de su concentración basal:**

En un vaso de precipitación de 1000 ml de capacidad se colocó 200 ml de agua destilada, con una micropipeta de 5 ml se añadió los volúmenes correspondientes de las sales minerales clasificadas por Stocks A, B, C, D, E, F, G Y H a la mitad de las concentraciones y vitaminas, se agregó 30 g sacarosa y se agitó, a esta solución se aforó a 1000 ml, se la dividió en cuatro alícuotas de 250 ml, donde se adicionó la hormona vegetal y 0,20 g de carbón activado a cada alícuota. Se ajustó el pH a 5.6 añadiendo gotas de NaOH y HCl a 0.1 N. El medio caliente se dispense en los frascos rotulados, los cuales se taparon con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, a una presión de 15 psi (libras por pulgada cuadrada) durante 20 minutos.

### **3.2.4.5 Inoculación de los explantes**

La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, donde se extrajo los segmentos desinfectados y fueron colocados en servilletas estériles. Con un bisturí se cortó las partes expuestas al hipoclorito (porciones de tallos y peciolo), dejando únicamente una parte del segmento. Posteriormente, se colocó con la ayuda de pinzas esterilizadas un explante por frasco. Luego se selló los frascos con rollopack para evitar la contaminación del medio y mantener la humedad relativa dentro del frasco, finalmente se rotuló los frascos.

### **3.2.4.6 Incubación**

Terminado la siembra de los explantes en los respectivos frascos, se los colocó en el cuarto crecimiento, con una temperatura promedio de 24 °C y una humedad relativa de 60%, una intensidad luminosa de 4 000 lux y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Primera Fase: Desinfección de yemas apicales

#### 4.1.1 Porcentaje de Contaminación

En el cuadro 13, gráfico 1, permite observar que el tratamiento t6 (NaClO al 20%; 10 minutos), se alcanzó alto porcentaje de explantes asépticos con un 87.50%, mientras que, la concentración t2 (NaClO al 10%; 10 minutos), presentó un porcentaje de explantes asépticos del 75.00%, y en último lugar la concentración t1 (NaClO al 10%; 5 minutos), obtiene un porcentaje bajo de explantes asépticos de 68.50%, en la prueba de chi cuadrado (cuadro 14) se obtuvo un valor de  $X^2=4.5059$  y un valor de  $p$  de 0.4791, que muestra que el efecto de la interacción de los dos factores - hipoclorito y tiempo- evaluados no es significativo sobre la variable contaminación, la contaminación presente se debe principalmente a hongos y bacterias que empezaron a crecer en el medio de cultivo a la segunda semana de haber realizado la siembra.

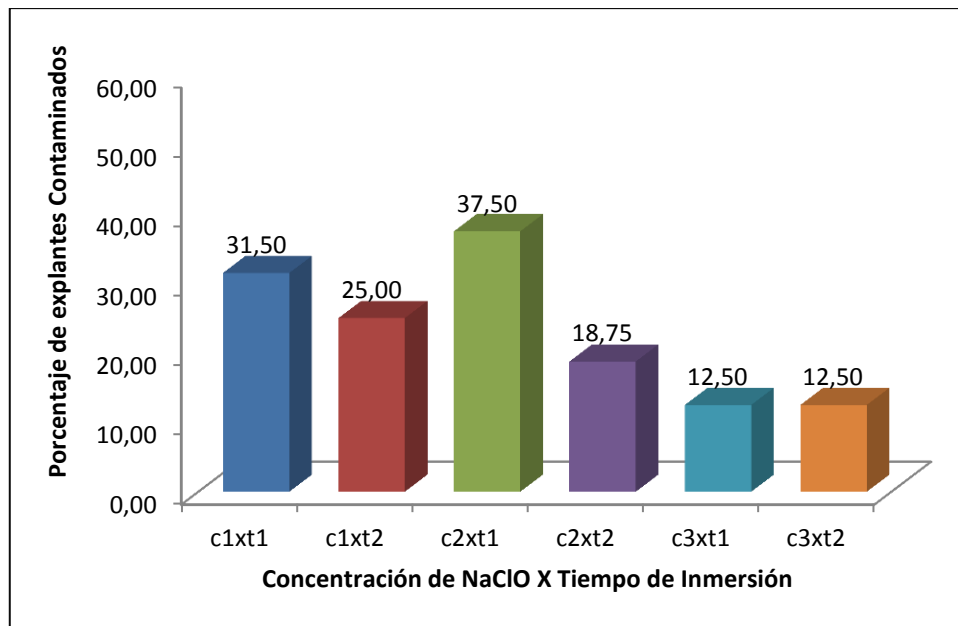
**Cuadro 13.** Evaluación de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

	Tratamientos		# de explantes contaminados	% de contaminación
	Concentración de NaClO (%)	Tiempo de inmersión (min)		
t1	10	5	5	31.50
t2	10	10	4	25.00
t3	15	5	6	37.50
t4	15	10	3	18.75
t5	20	5	2	12.5
t6	20	10	2	12.50

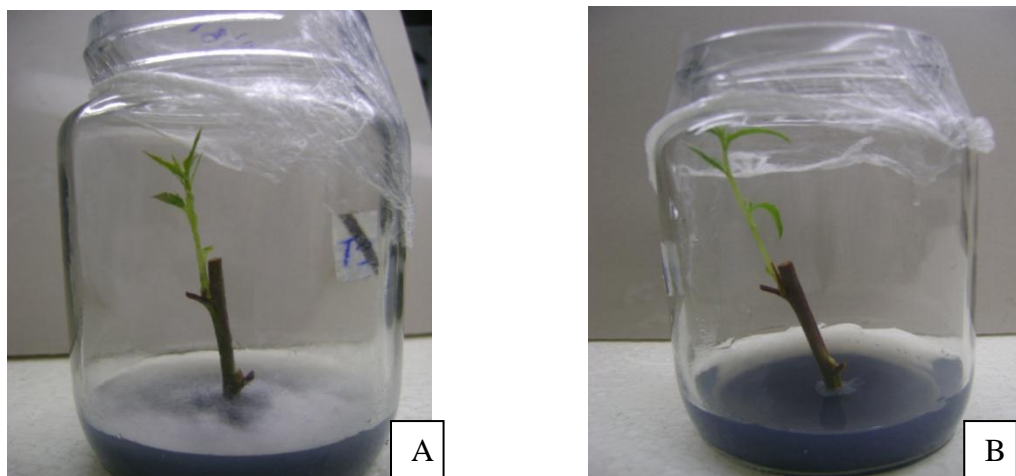
**Cuadro 14.** Prueba de chi cuadrado para el hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión en la variable contaminación en la fase de desinfección en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,5059	5	0,4791



**Gráfico 1.** Promedios de la evaluación contaminación para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.



**Fotografía 01.** (A) Contaminación por hongo. (B). Contaminación por bacteria

Los resultados de la tasa de contaminación se puede atribuir al manejo de la planta donante, la posibilidad de que existan agentes endógenos que no son fácilmente eliminados con una desinfección superficial, esto se confirma con lo señalado por el CIAT (1980), señalando que la concentración de microorganismos contaminantes presentes en el tejido depende de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, argumentando que el mayor número de microorganismos se encontrará en tejidos provenientes del campo que del invernadero. En los resultados obtenidos se pudo observar que la mayor parte de contaminantes en los medios de cultivo fue de hongos y bacterias, esto se concuerda con lo señalado por Folgueras *et al*, (2001); Rodríguez *et al* (2008) quienes mencionan que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas adultas son hongos y bacterias que habitan de manera normal en el cultivo de las mismas condiciones naturales.

#### 4.1.1.1. Factor concentración de Hipoclorito de sodio

Las frecuencias obtenidas (Cuadro 15) señala mayor contaminación en la concentración C1 (NaClO 10%) con una contaminación de 28.12%. Se observó que conforme se aumenta la concentración de hipoclorito de sodio la contaminación baja (Gráfico 2). El cuadro 16, muestra la prueba de chi cuyo valor obtenido fue de  $X^2 = 3.4091$  y su valor respectivo de  $p$  de 0.1819, que muestra que el efecto de la interacción concentración de hipoclorito de sodio no es significativo sobre la variable contaminación.

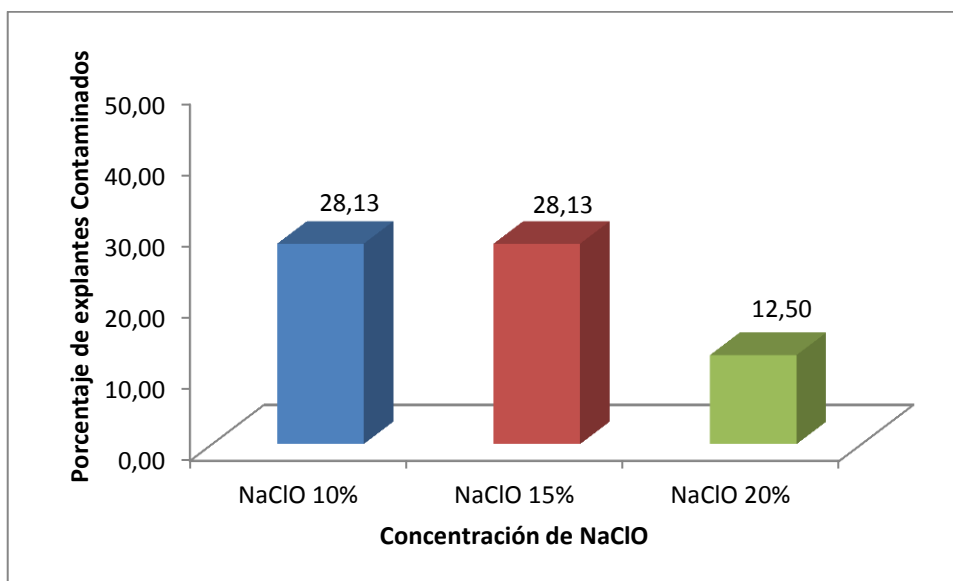
**Cuadro 15.** Evaluación del factor hipoclorito de sodio para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Concentración de NaClO (%)	# de explantes contaminados	% de contaminación
10	9	28.13
15	9	28.13
20	4	12.50

**Cuadro 16.** Prueba de chi cuadrado para el factor hipoclorito de sodio para la variable contaminación en la fase de desinfección en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,4091	2	0,1819



**Gráfico 2.** Promedios del factor Hipoclorito de sodio en la evaluación contaminación para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

La utilización del hipoclorito de sodio en la desinfección del material vegetal, es necesario para la eliminación de microorganismos por su capacidad germicida, esto es corroborado por Rojas, *et al* 2008 quien manifiesta que, el hipoclorito de sodio puede actuar penetrando en la pared celular de las bacterias alterando las funciones específicas de las proteínas e inhibiendo procesos metabólicos

La aplicación además de agentes microbiocidas como Savlón y Povidyn sobre la superficie de los explantes influye en mantener un explante aséptico, la presencia de microorganismos endógenos es imprescindible que se debe principalmente a que el medio reúne las condiciones ideales para el crecimiento y desarrollo, esto se confirma con lo mencionado por Cassells, 1991; Debergh, 1982, quienes consideran que, la presencia de microorganismos endófitos son el factor más importante, responsable de las mayores pérdidas del cultivo in vitro, igualmente Enjalric, et al., 1998 adule que, pueden aparecer en cualquier fase del cultivo y su detección es difícil de realizar, pues la mayoría de estas bacterias normalmente crecen muy poco en los medios de cultivo o crecen solo después de largos períodos de incubación y de subcultivos.

En observaciones realizadas durante la investigación se pudo observar que después de realizar los subcultivos los explantes presentaron contaminación bacteriana y fúngica, se presume que es principalmente por microorganismos endógenos, esto coincide con lo señalado con Suárez *et al* 2006, que manifiesta que en los enjuagues previos con fungicidas y bactericidas complementados con la desinfección superficial con hipoclorito de sodio no son suficientes para eliminar completamente los contaminantes presentes en la superficie de los explantes; incluso, observaciones posteriores permitieron detectar la presencia de contaminaciones en explantes sanos después de varios subcultivos debiéndose probablemente a infecciones de expresión tardía

El crecimiento de hongos en el cultivo se controló con el uso fungicidas sistémicos (Benopac y Azoxystrobin) que actúan impidiendo e inhibiendo la germinación de esporas y el crecimiento o penetración del micelio ya que según Castellanos L., 2011 y Malagañón J., 2005 concuerdan que la aplicación de estos fungicidas mitigan la contaminación. Finalmente los explantes sanos aunque contaminados, son todavía viables porque sus tejidos están vivos y se seguirán desarrollando, posiblemente para bajar la carga microbiana sea necesario realizar otros lavados incorporando en la desinfección algún tipo de agente biocida

#### **4.1.1.2. Factor Tiempo de inmersión**

El factor tiempo de inmersión (Cuadro 17) muestran las frecuencias obtenidas señalando mayor contaminación (27.08%) a los cinco minutos y un menor contaminación (18.75%) a los 10 minutos. Se observó también que conforme se aumenta el tiempo de inmersión la contaminación baja (Gráfico 3). El cuadro 18, se muestra la prueba de chi cuyo valor obtenido fue de  $X^2 = 0.8182$  y su valor respectivo de  $p$  de 0.3657, que muestra que el efecto del tiempo de inmersión evaluado no es significativo sobre la variable contaminación.



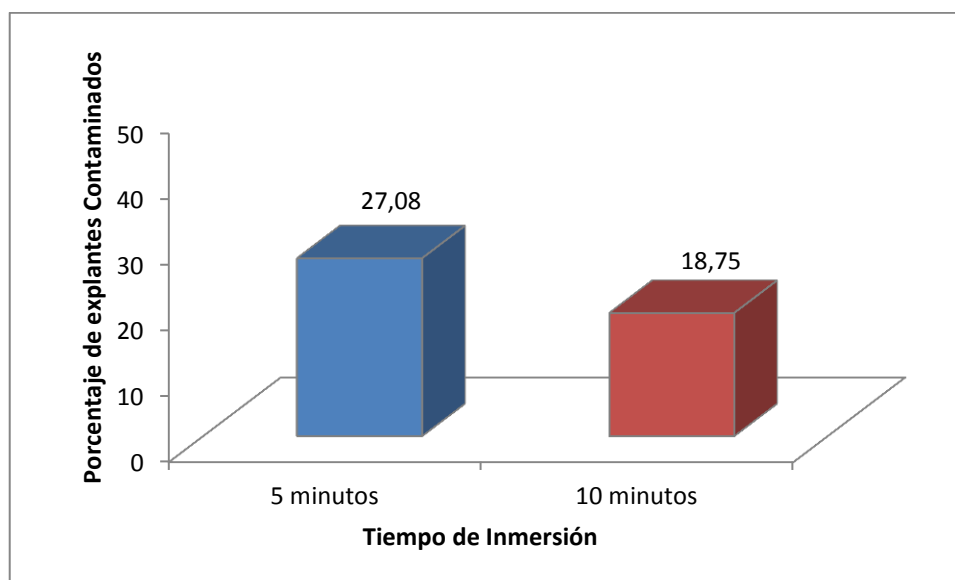
**Cuadro 17.** Evaluación del factor tiempo de inmersión para la variable porcentaje de contaminación en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Tiempo de inmersión (min)	# de explantes contaminados	% de contaminación
5	13	27.08
10	9	18.75

**Cuadro 18.** Prueba de chi cuadrado para la variable tiempo de inmersión en la fase de desinfección en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,8182	1	0,3657



**Gráfico 3.** Promedios de la evaluación tiempos de inmersión para la desinfección en la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

#### 4.1.2 Porcentaje de Viabilidad

En el cuadro 19, gráfico 4, permite observar que el tratamiento c1xt1 (NaClO al 10%; 5 minutos), obtiene alto porcentaje de explantes viables con un 93.75%, mientras que, el tratamiento c2xt2 (NaClO al 15%; 10 minutos), obtiene bajo porcentaje de explantes viables con 81.25%, y en último lugar la concentración c3xt2 (NaClO al 20%; 10 minutos), obtiene un porcentaje de explantes viables de 37.25%, en la prueba de chi cuadrado (cuadro 20), se obtuvo un valor de  $X^2 = 18.0649$  y un valor de  $p$  de 0.002866, que muestra que el efecto de la interacción de los dos factores -hipoclorito y el tiempo- evaluados son es significativo sobre la variable viabilidad.

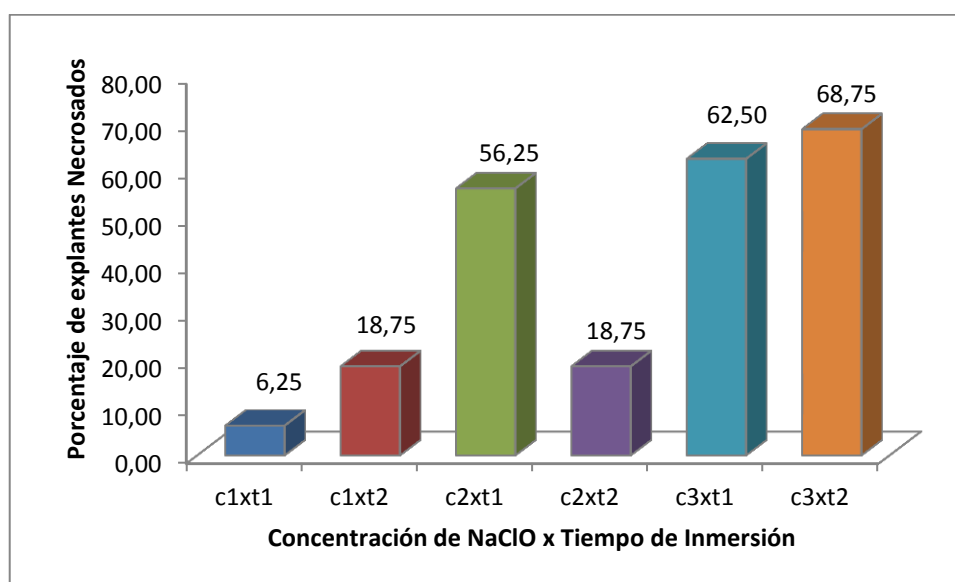
**Cuadro 19.** Evaluación de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión para la variable viabilidad en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

	Tratamientos		# de explantes Necrosados	% de explantes necrosados
	Concentración de NaClO (%)	Tiempo de inmersión (min)		
t1	10	5	1	6.25
t2	10	10	3	18.75
t3	15	5	9	56.25
t4	15	10	3	18.75
t5	20	5	10	62.50
t6	20	10	11	68.75

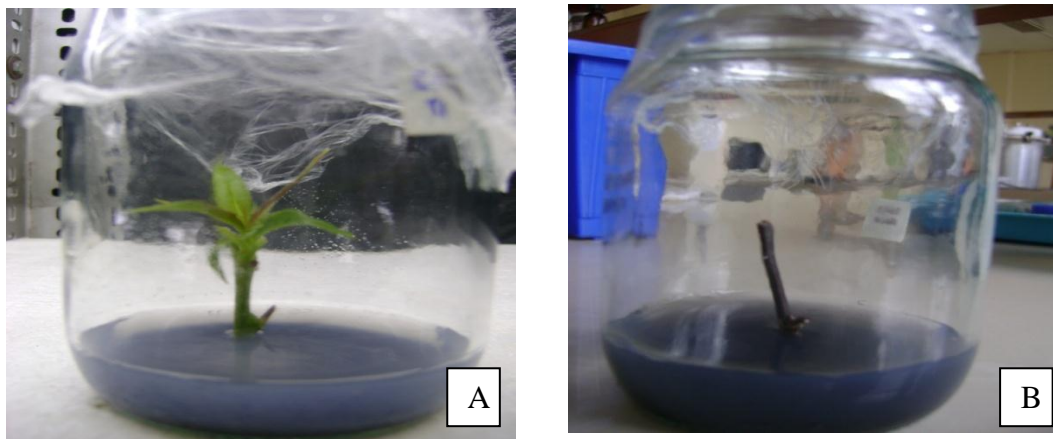
**Cuadro 20.** Prueba de chi cuadrado para el hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión en la variable viabilidad en la desinfección de la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	18,0649	5	0,002866



**Gráfico 4.** Promedios de la concentración de NaClO y tiempo de inmersión para la variable viabilidad en la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.



**Fotografía 02.** (A) Tejido viable. (B) Tejido necrosado

#### 4.1.2.1. Factor Hipoclorito de sodio

El factor concentración de hipoclorito de sodio (Cuadro 21) muestran las frecuencias obtenidas señalando mayor necrosamiento de 65.62% a una concentración de 20% de NaClO y un menor porcentaje de necrosamiento de 12.50% a una concentración de 10% de NaClO. Se observó también que conforme se aumenta la concentración de NaClO baja la viabilidad (Gráfico 5). El cuadro 22, se muestra la prueba de chi cuyo valor obtenido fue de  $X^2 = 17,5946$  y su valor respectivo de  $p$  de 0.00015, que muestra que el efecto del tiempo de inmersión evaluados es significativo sobre la variable viabilidad.

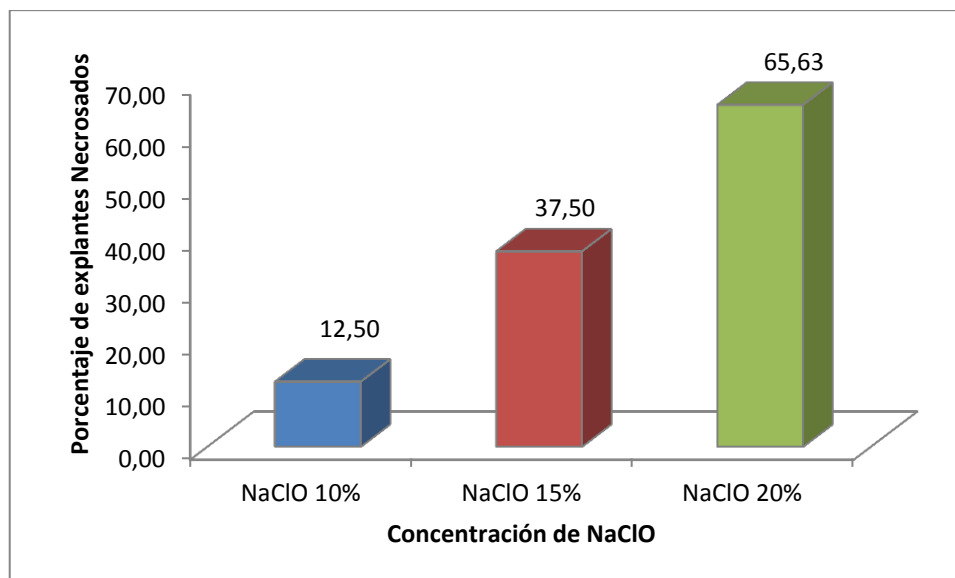
**Cuadro 21.** Evaluación del factor hipoclorito de sodio para la variable porcentaje de viabilidad en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Concentración de NaClO (%)	# de explantes necrosados	% de explantes necrosados
10	4	12.50
15	12	37.50
20	21	65.63

**Cuadro 22.** Prueba de chi cuadrado para el factor hipoclorito de sodio en la variable viabilidad en la fase de desinfección en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	17,5946	2	0,0001511



**Gráfico 5.** Promedios de la evaluación viabilidad para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Los resultados obtenidos para las concentraciones de hipoclorito de sodio dependen del origen del explante para la obtención de una buena desinfección, según Hurtado y Merino (1988), se refieren que la desinfección varía en dependencia del tipo de explante, de la planta con la que se trabaje y del tipo de sustancia química empleada.

El necrosamiento de los explantes puede deber a la exposición de los explantes a la luz o al exceso de la concentración de hipoclorito de sodio, esto hace referencia por lo manifestado por Pedroza (2007) indicando que, el incremento de la concentración de de hipoclorito de sodio necrosa los tejidos siendo este producto capaz de disolver la capa epicuticular, dañando así el tejido vegetal. La alta oxidación presente en los explantes se manifestó con el cambio de coloración en el tejido de un color verde a un color café oscuro, que se inicio principalmente en las partes donde se les realizó los cortes y termina con una necrosis que se extendió a todo el explante.

#### 4.1.2.2 Factor Tiempo de Inmersión

Las frecuencias obtenidas (Cuadro 23) determinaron mayor viabilidad (58.33%) a los cinco minutos y una menor viabilidad (64.58%) a los 10 minutos. Se observó que conforme se aumenta el tiempo de inmersión la viabilidad baja (Gráfico 6). El cuadro 24, muestra el valor de chi cuadrado obtenido que fue de  $X^2 = 0.2162$  y su valor respectivo de  $p$  de 0.6419 que muestra que el efecto de la interacción del factor tiempo de inmersión evaluado que no es significativo sobre la variable viabilidad

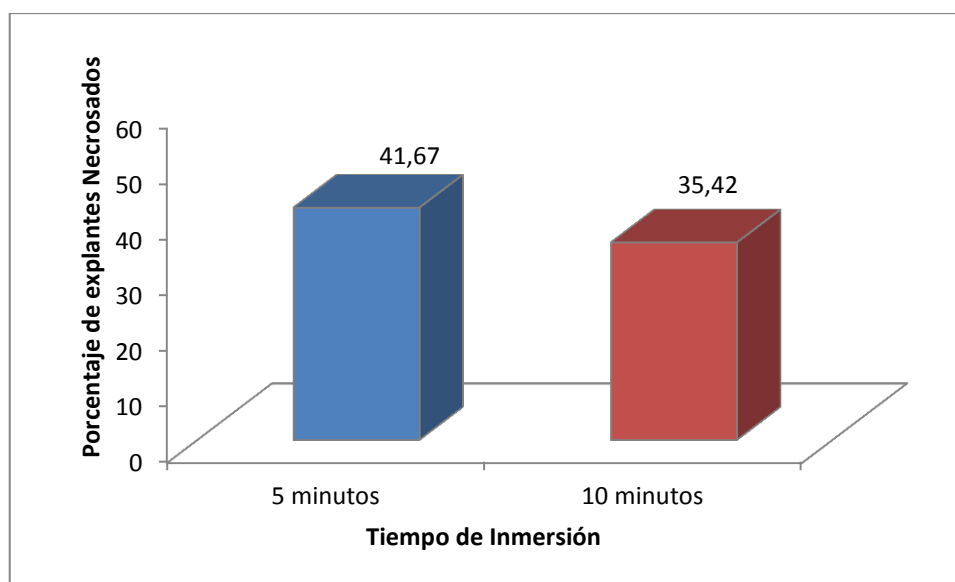
**Cuadro 23.** Evaluación del factor tiempo de inmersión para la variable porcentaje de viabilidad en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Concentración de NaClO (%)	# de explantes necrosados	% explantes necrosados
5	20	41.66
10	17	35.42

**Cuadro 24.** Prueba de chi cuadrado para la variable tiempo de inmersión en la fase de desinfección en la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,2162	1	0,6419



**Gráfico 6.** Promedios de la evaluación tiempos de inmersión para la viabilidad en la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

La aplicación de antioxidantes como el carbón activado en el medio permitió minimizar la secreción de sustancias como polifenoles y taninos producidos por la ruptura de las células al momento de realizar un corte, estas sustancias bioquímicas interfiere con el normal desarrollo de los explantes inoculados en los medios de cultivo, según Levitus G., 2008 el uso del carbón activado contribuye a la disminución del proceso de oxidación del explante este material presenta una gran porosidad y por ende una capacidad de adsorber o retener los fenoles, metabolitos presentes en el medio e cultivo, además captura el exceso de reguladores de crecimiento, que según Pan y van Staden, 1998, puede ser usado como promotor o inhibidor de crecimiento *in vitro*, en función de la especie y del tipo de explante, establece condiciones de oscuridad, adsorbe inhibidores, reguladores de crecimiento o libera sustancias promotoras de crecimiento presentes en el medio o adsorbidas.

George (2008) y Dávila (2011), sugieren que los explantes tomados de plantas adultas producen mayor cantidad de sustancias fenólicas que oscurecen el medio en comparación a los explantes de plantas juveniles que reduce el exceso de la cantidad de fenoles excretados por la planta en el momento de utilizar sus yemas en el proceso *in vitro* esto con la finalidad de reducir la oxidación en el medio en momento de la siembra.

## 4.2 Segunda Fase: Brotación de yemas apicales

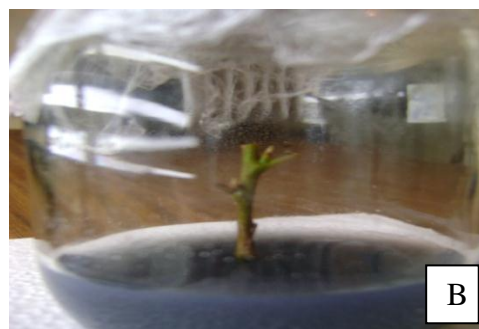
### 4.2.1 Días a la formación de brotes

El Análisis de Varianza para la variable días a la brotación (Cuadro 25), se detectó, diferencias significativa para el factor de dosis de BAP (B), así como para la tendencia lineal y para la interacción MxB y y ninguna significancia estadística para la los medios de cultivo (M). El promedio general del experimento fue de 11.35 días a la formación de brotes. El coeficiente de variación fue de 8.49% valor que demuestra que para este tipo de experimento es excelente lo que avala que se realizó en condiciones homogéneas.

**Cuadro 25.** Análisis de la varianza para la variable días a la formación del brote, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Total	72,812	47		
medios_cultivo	0,19	1	0,19	0,20 ns
dosis_BAP	18,06	3	6,02	6,48 *
Lineal	16,54	1	16,54	17,80 **
Cuadrática	0,02	1	0,02	0,02 ns
Cúbica	1,50	1	1,50	1,62 ns
medios_cultivo * dosis_BAP	3,56	3	1,19	1,28 *
Error	37,17	40		
Promedio	11.35 días a la aparición del brote			
Coeficiente de variación	8.49 %			
R <sup>2</sup>	0.37			

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 4), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor *p* de 0.330, que determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de *p* de 0.164 que no es significativo y se asume que hay una homogenidad entre varianzas de los tratamientos empleados.



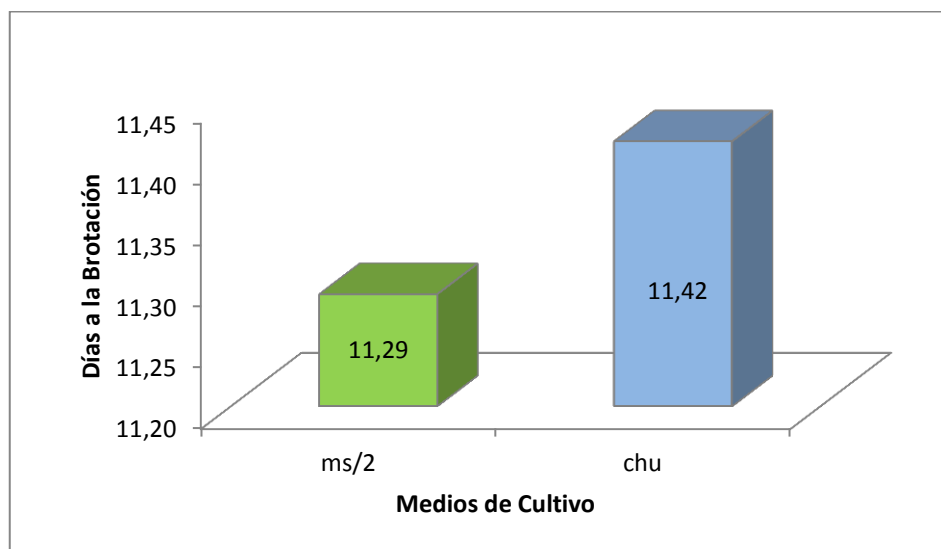
**Fotografía 03.** (A) Brotación en N6. (B) Brotación en MS1/2

**Cuadro 26.** Promedios para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Días a la formación de brotes
<b>m1</b>	(MS ½)	11.29
<b>m2</b>	(N6)	11.42

El cuadro de promedios para el factor medios de cultivo (Cuadro 26 y Gráfico 7) identifica al medio m1 (MS ½) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 11,29 días a la brotación, mientras que, con el menor promedio se identifica al medio m2 (N6) con un promedio de 11.42 días a la brotación.

La significación estadística revelada para medios de cultivo, muestra una similitud tanto para MS½ como para N6, la diferencia relativa es la composición de los nutrientes, que se basa especialmente en los elementos nitrato, potasio y amonio - lo que establece Murashige Skoog-, según Uribe y Cifuentes (2004) reportan que Murashige & Skoog tiene mayor concentración de algunos elementos como nitrógeno y potasio, que tienen una acción de estimulante sobre la formación de yemas, sin embargo López (1998) afirma que muchas especies, el desarrollo de yemas se ve favorecido usando medios nutritivos reducidos en concentración de sales, a pesar de lo confirmado, Pierik (1987) explica que la reducción de la concentración de nutrientes es debido a que algunos explantes son muy sensibles a la sales, mientras que otras pueden tolerar altas concentraciones además de los mencionado Botti (1992) alude que, la concentración de sales empleadas se encuentra relacionada con la especie que se someta a condiciones *in vitro*, en general para especies leñosas, optando por diluir las sales a la mitad, o si es necesario, a un cuarto de su concentración obteniendo mejores resultados.



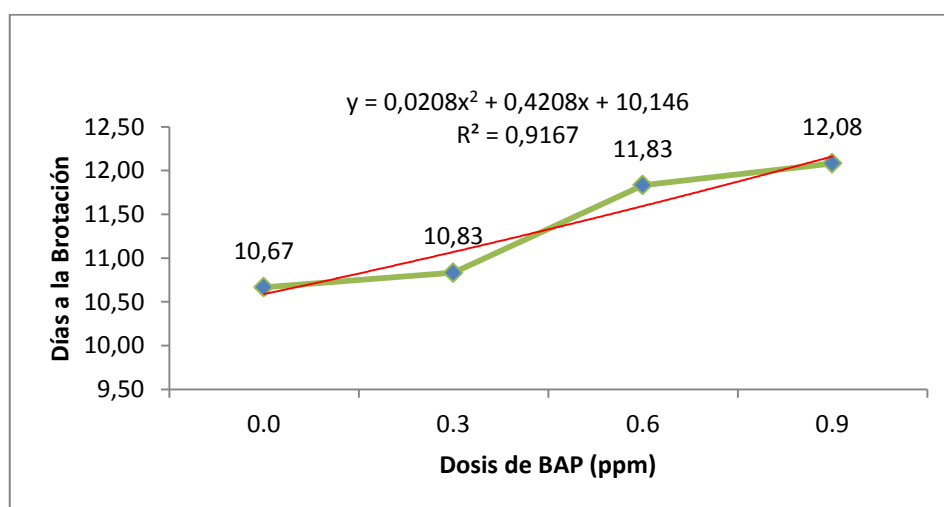
**Gráfico 7.** Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable días a la formación de brotes para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Cuadro 27.** Tukey al 5% para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Concentración de BAP (ppm)	Días a la formación de brotes
<b>b0</b>	0.0	10.67 a
<b>b1</b>	0.3	10.83 a b
<b>b2</b>	0.6	11.83 b c
<b>b3</b>	0.9	12.08 c

Tukey al 5% para el factor dosis de BAP (Cuadro 27 y Gráfico 8) identifica dos rangos de significación estadística, ubicándose en el primer rango con la mayor respuesta, las dosis b0 (0.0 ppm BAP) con un promedio de 10.67 días a la brotación, mientras que, en segundo rango con la menor respuesta se ubica la dosis b3 (0.9 ppm BA) con un promedio de 12.08 días a la brotación, estas diferencias tal vez se deban al tipo de explante utilizado y a la época de recolección debido a que se realizó con explantes jóvenes e indiferenciados, que es una regla general para obtener mejores respuestas *in vitro*, en lo que se refiere al tiempo de recolección del explante Roca (1993), manifiesta que, la mejor época de recolección es cuando la planta madre está produciendo nuevos brotes vigorosos de manera que las yemas responderán mejor a los tratamientos, esto puede deberse a que ciertas yemas se encuentran en un grado de dormancia.

Es evidente que la concentración hormonal tienen un papel esencial en la aparición de brotes *in vitro*, se observó que a niveles bajos de BAP proporcionados, la respuesta en la estimulación de los brotes es mínima, según Roca y Mroginski (1993) manifiestan que, la citocinina promueve la emisión de brotes debido a la división y crecimiento celular acelerado e incrementando la producción de yemas y brotes, y que de acuerdo a la concentración, puede promover o inhibir el crecimiento de brotes, si embargo para esta investigación así como en experiencia con mora se ha evaluado la hormona sintética 6-bencilaminopurina, siendo una de las más eficientes y utilizadas en especies forestales para estimular el crecimiento y desarrollo de nuevos brotes (Muñoz y Reyes, 2006)



**Gráfico 8.** Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable días a la formación de brotes para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.



Al establecer la ecuación de la regresión (Gráfico 8), se determina que a una dosis de 0.0 ppm de BAP se obtiene una disminución en días para la brotación de 8.02 días, en tanto que, cuando la dosis se incrementa, el número de días aumenta. El coeficiente de determinación calculado fue de 92 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones.

Los resultados expresados se ajustan a lo mencionado por Gonzales *et al* 2002, manifestando que, cuando se suministra valores altos para las concentraciones BAP hay disminución en la eficiencia en los proceso metabólicos, dado probablemente por un efecto inhibitorio de esta citoquinina durante el crecimiento. Además concuerdan con lo establecido por Skoog y Miller (1957), quienes plantearon que un balance favorable a las citoquininas impulsa el desarrollo de los brotes foliares. Del mismo modo, se observa que los resultados coinciden con los reportados en otras experiencias similares, mientras que Loh y Rao (1989) determinaron el efecto óptimo de BAP en la brotación de yemas al suplementar al medio con 0.1 ppm de la misma citoquinina. Lo anterior indica que el nivel de requerimiento de BAP podría estar estrictamente relacionado con la edad de la planta progenitora, constitución genética de las plantas y el efecto del medio ambiente en donde se desarrolla el individuo.

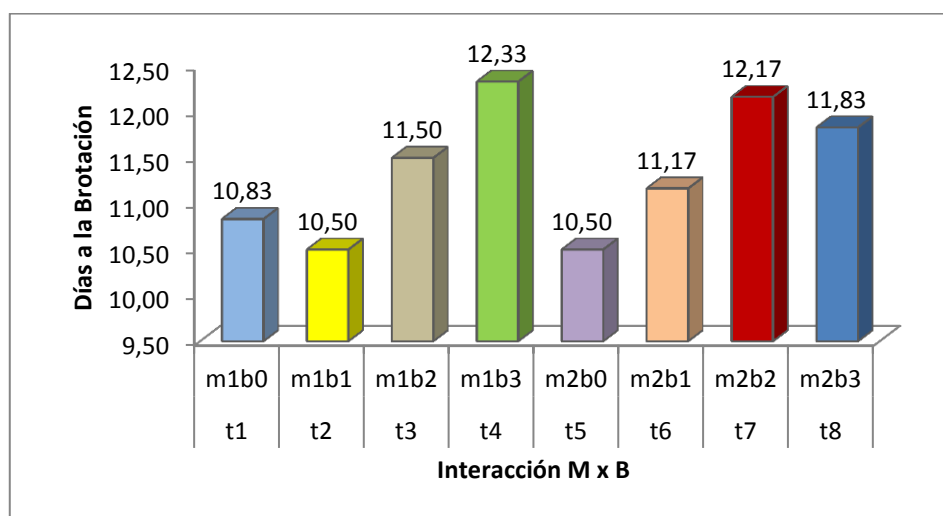
**Cuadro 28.** Tukey al 5% para la variable días a la formación de brotes, en la evaluación de la interacción M x B para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacción M x B	Días a la formación de brotes
<b>m2b0</b>	N6;0,0 de BAP	10.50 a
<b>m1b1</b>	MS ½;0.3 de BAP	10.50 a
<b>m1b0</b>	MS ½;0.0 de BAP	10.83 a b
<b>m2b1</b>	N6;0,3 de BAP	11.17 a b
<b>m1b2</b>	MS ½;0.6 de BAP	11.50 a b
<b>m2b3</b>	N6;0.9 de BAP	11.83 a b
<b>m2b2</b>	N6;0.6 de BAP	12.17 a b
<b>m1b3</b>	MS ½;0.9 de BAP	12.33 b

Tukey al 5% para la interacción M x B (Cuadro 28 y Gráfico 9) reveló dos rangos de significación, identifica al medio m2b1 (N6; 0,0 ppm de BAP) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 10,50 días a la brotación, mientras que, con un menor promedio se identifica al medio m1b3 (MS ½; 0,9 ppm de BAP) con un promedio de 12,33 días a la brotación.

El resultado de la interacción MxB se alude que se debe a la adición al medio nutritivo de vitaminas junto con el mioinositol, este último según Pierik, (1990) manifiesta que, el mioinositol se ve involucrado con el crecimiento especialmente cuando va combinado con vitaminas, participa en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas, además que la dosis con BAP permite la estimulación de las yemas, se podría justificar porque el 6- bencilaminopurina (BAP), se encuentra entre una de las citoquininas más activas, Pati *et al.*, señalan que el BAP es el biorregulador de crecimiento más efectivo en cuanto a la estimulación de brotes. En los ensayos realizados por Encina y Padilla (2003), obtuvieron un surgimiento de los brotes de 100%,

manifestando que se debe al medio de cultivo utilizado, las diferencias tal vez se deban al tipo de material utilizado, puesto que se alcanzan mejores resultados con relación a estudios realizados con material no juvenil.



**Gráfico 9.** Promedio para la variable de días a la formación de brotes en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

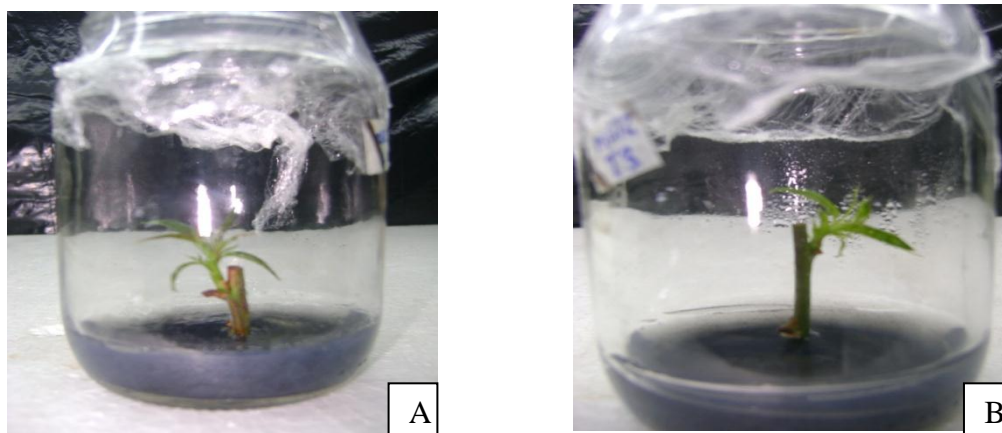
#### 4.2.2 Número de yemas

Análisis de Varianza para la variable número de yemas (Cuadro 29) detectó, ninguna significancia estadística para el factor de medios de cultivo (M), dosis de 6-bencilaminopurina y significancia estadística para la interacción M x B y para la tendencia lineal. El promedio general del experimento fue de 5.16 yemas por explante establecido. El coeficiente de variación fue de 14.42% valor que demuestra que para este tipo de experimento es bueno lo que avala que se realizó en condiciones homogéneas.

**Cuadro 29.** Análisis de la varianza para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	S.C	Gl	C.M	F
Total	41,03	47		
medios_cultivo	0,01	1	0,01	0,01 ns
dosis_BAP	19,48	3	6,49	12,74 *
lineal	18,88	1	18,88	37,06 **
Cuadrática	0,15	1	0,15	0,29 ns
Cúbica	0,45	1	0,45	0,87 ns
medios_cultivo * dosis_BAP	1,16	3	0,39	0,79 *
Error	22,38	40	0,51	
Promedio	4.24 yemas por brote			
Coeficiente de variación	16.84 %			
R <sup>2</sup>	0.50			

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 5), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor  $p$  de 0.362, que determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de  $p$  de 0.052 que no es significativo asumiendo que hay una homogeneidad entre varianzas de los tratamientos empleados.

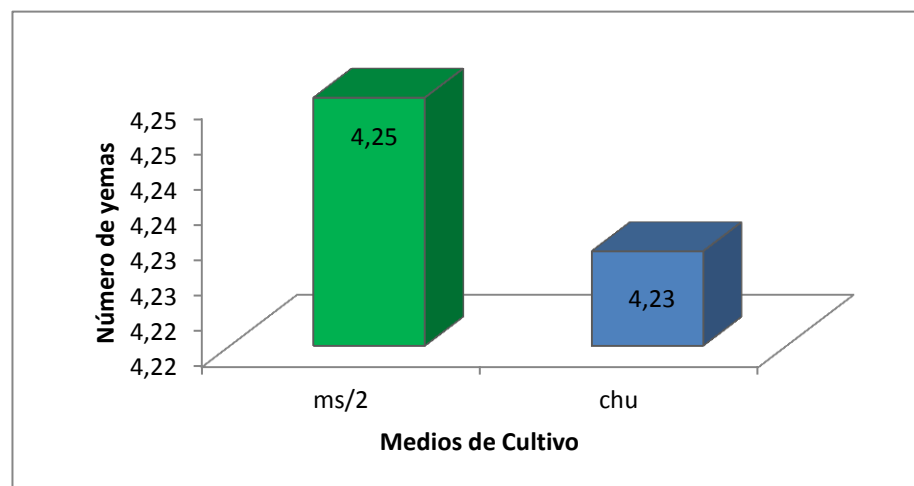


**Fotografía4.** (A) Yema formada en N6. (B) Yema formada en MS1/2

**Cuadro 30.** Promedios para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Número de yemas formadas
<b>m1</b>	(MS ½)	4,25 a
<b>m2</b>	(N6)	4,23 a

El cuadro de promedios para el factor medios de cultivo (Cuadro 30 y Gráfico 10) identifica al medio m1 (MS½) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 4.25 yemas por explante, mientras que el medio m2 (N6) presenta un menor promedio de 4.23 yemas por explante. La significancia estadística indica que la respuesta de los medio de cultivos para la variable número de yemas formadas tiene un efecto similar en el comportamiento de las yemas, el promedio de yemas obtenidos en esta investigación es alta, resultados que son constatados por Amutha *et al.* (2006), quienes argumentan que las tasas de multiplicación reportadas en la mayoría de especies son altas.



**Gráfico 10.** Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable número de yemas formadas para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

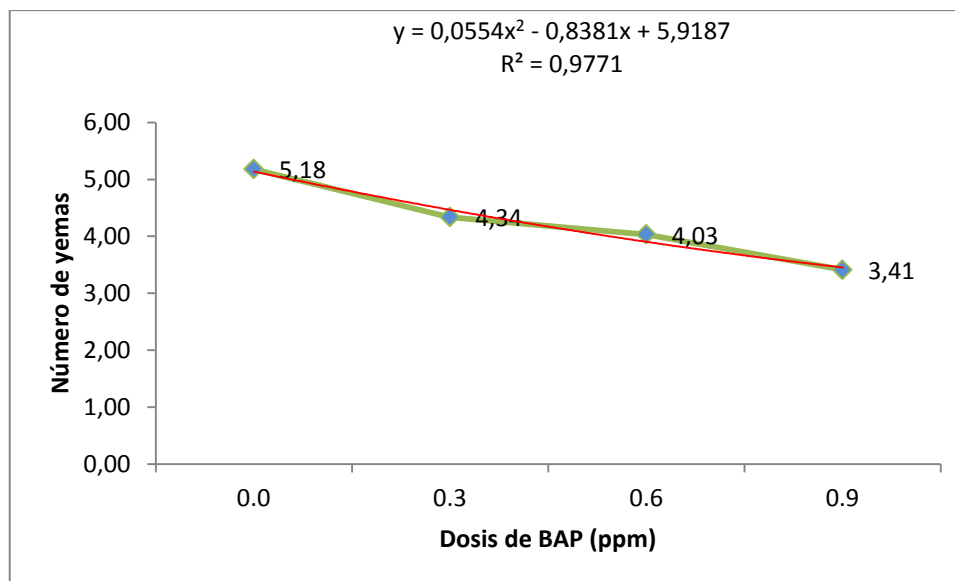
**Cuadro 31.** Tukey al 5% para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Concentración de BAP (ppm)	Número de yemas formadas
<b>b0</b>	0.0	5.18 a
<b>b1</b>	0.3	4.34 b
<b>b2</b>	0.6	4.03 b c
<b>b3</b>	0.9	3.41 c

El cuadro de promedios para el factor dosis de BAP (Cuadro 31 y Gráfico 11) identifica a la dosis b0 (0.0 ppm de BAP) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 5.17 yemas por explante; en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio b3 (0.9 ppm de BAP) con un promedio de 3.50 yemas por explante.

El uso de meristemas axilares en numerosas especies mantiene gran una importancia, en el caso de la micropropagación de especies leñosas la edad del explante tiene un factor crítico (Roca, 1993). Si los tejidos son jóvenes las posibilidades son mayores a ser exitosas que con tejidos maduros, esto se evidenció en el porcentaje de explantes que presentaron brotes, los cuales se elongaron de manera adecuada.

Roca (1993), manifiesta que un factor importante para la obtención de yemas formadas, es el tiempo de recolección de los explantes, que la mejor época de recolección es en primavera cuando las plantas madres están produciendo nuevos brotes vigorosos. Es así que este es un factor que no solo reduce la infección de microorganismos, sino que las yemas también responden mejor a los tratamientos, debido a que ciertas yemas están en un grado de dormancia.



**Gráfico 11.** Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable número de yemas formadas para la micropropagación de *Capulí (Prunus serotina spp capuli)*. Quito, Pichincha. 2014.

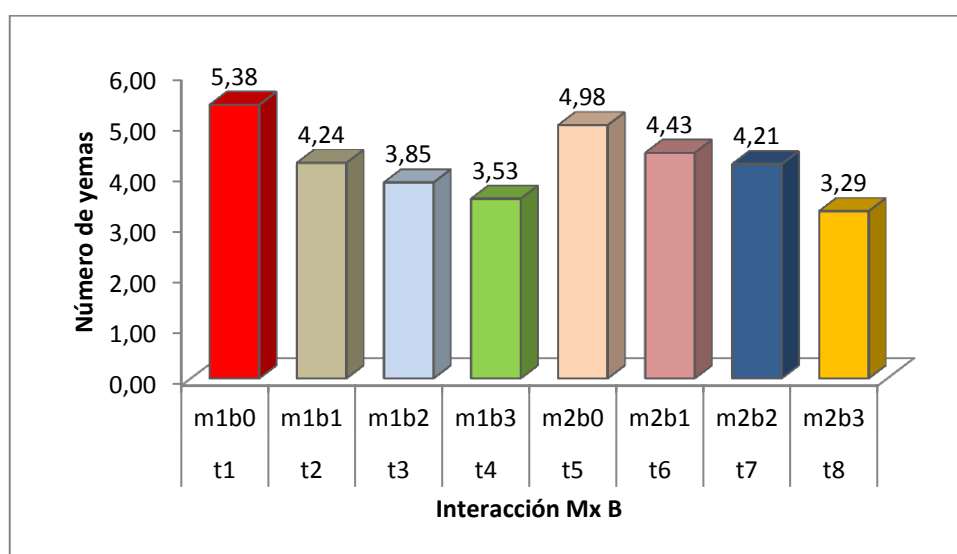
Al determinar la ecuación de la regresión (Gráfico 11), se determina que a una dosis de 0.0 ppm de BAP se obtiene un alto número de yemas presentadas llegando a obtener de 5.92 yemas por explante, en tanto que, cuando la dosis se incrementa, el número tiende a disminuir. El coeficiente de determinación calculado fue de 98 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones.

**Cuadro 32.** Tukey al 5% para la variable número de yemas formadas, en la evaluación de la interacción M x B para la micropropagación de *Capulí (Prunus serotina ssp capuli)*. Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacción M x B	Número de yemas formadas
<b>m1b0</b>	MS½;0.0 de BAP	5.33 a
<b>m2b0</b>	N6;0.0 de BAP	5.00 a
<b>m2b1</b>	N6;0.3 de BAP	4.50 a b c
<b>m1b1</b>	MS½;0.3 de BAP	4.17 a b c
<b>m2b2</b>	N6;0.6 de BAP	4.17 a b c
<b>m1b2</b>	MS½;0.6 de BAP	3.83 b c
<b>m1b3</b>	MS½;0.9 de BAP	3.67 b c
<b>m2b3</b>	N6;0.9 de BAP	3.33 c

Tukey al 5% para la interacción M x B (Cuadro 32 y Gráfico 12), identifica a la interacción m1b0 (MS½; 0,0 ppm de BAP) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 5.33 yemas formadas, en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m2b3 (N6; 0,9 ppm de BAP) con un promedio de 3.33 yemas formadas.

Estas diferencias tal vez se deban al tipo de explante utilizado, siendo los mejores resultados con material no juvenil que en general solo conseguían la elongación del brote este es un aspecto importante en la morfogénesis en las yemas, es preferible mantener una elongación adecuada y números de yemas correspondiente a este tamaño, siendo el resultado final un incremento de la cantidad de explantes en el proceso de multiplicación, se observó que al incrementarse la dosis de citoquinina las yemas obtenidas son menores esto se debe al efecto inhibitorio que produce estas hormonas por lo que es necesario mantener un balance adecuado para obtener un tratamiento efectivo, George (2008), señala que a niveles altos de citoquinina pueden causar una disminución en el tamaño y en el número de yemas en el explante.



**Gráfico 12.** Promedio de número de yemas formadas en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina* spp *capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

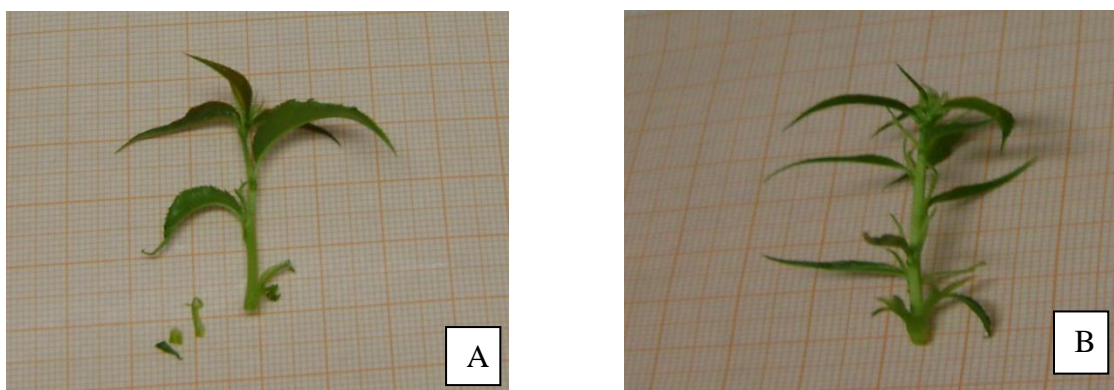
#### 4.2.3 Altura del Brote

El Análisis de Varianza para la variable altura del brote (Cuadro 33) se detectó, significancia para dosis (BAP) y para la interacción M x B, y no significancia estadística para el factor de medios de cultivo (M). El promedio general del experimento fue de 2.68 centímetros de longitud de explante establecido. El coeficiente de variación fue de 8,77% valor que demuestra que para este tipo de experimento es excelente lo que avala que se realizó en condiciones homogéneas.

**Cuadro 33.** Análisis de la varianza para la variable de altura del brote, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F
Total	349,040	47		
medios_cultivo	0,08	1	0,083	0,96 ns
dosis_BAP	0,82	3	0,273	4,92 *
lineal	0,52	1	0,52	9,43 *
cuadrático	0,07	1	0,07	1,22 ns
cúbico	0,23	1	0,23	4,12 *
medios_cultivo * dosis_BAP	0,31	3	0,103	2,04 *
Error	2,22	40	0,055	
Promedio				
2.68 cm de altura del brote				
Coeficiente de variación				
8.77 %				
R <sup>2</sup>				
0.35				

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 6), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor *p* de 0.384, que determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de *p* de 0.567 que demuestra que no es significativo asumiendo que hay una homogeneidad entre varianzas de los tratamientos empleados.



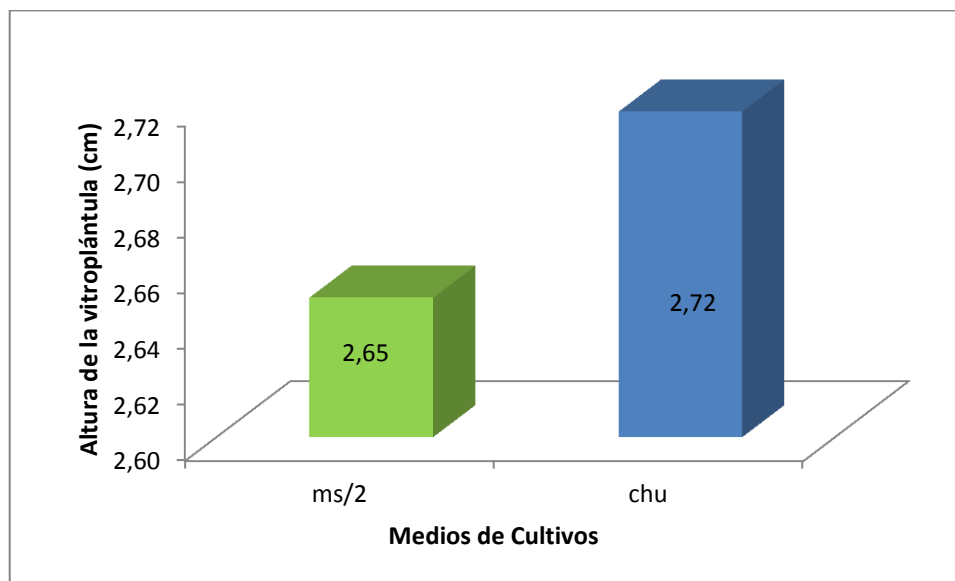
Fotografía 5. (A) Altura del Brote en N6. (B) Altura del Brote en MS1/2

**Cuadro 34.** Promedios para la variable altura del brote, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Altura del brote (cm)
<b>m1</b>	(MS ½)	2.73
<b>m2</b>	(N6)	2.64

El cuadro de promedios para el factor medios de cultivo (Cuadro 34 y Gráfico 13) identifica al medio m1 (MS½) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 2.73 cm de altura por explante; en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m2 (N6) con un promedio de 2.64 cm de altura por explante.

La significancia obtenida muestra que, para los factores medios de cultivo m1 (MS½) obtuvo la mejor respuesta con un promedio de 2.73 cm de altura, pues como explica Preece y Sutter (1991) citado por (Muñoz, 2003) la baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas. A más de ello, cambiando los nutrientes del medio de cultivo se puede alterar el porcentaje de explantes que formen brotes adventicios y/o el número de brotes adventicios (Thorpe, 1991).



**Gráfico 13.** Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable altura del brote, para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Cuadro 35.** Tukey al 5% para la variable altura del brote, en la evaluación de dosis de BAP para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

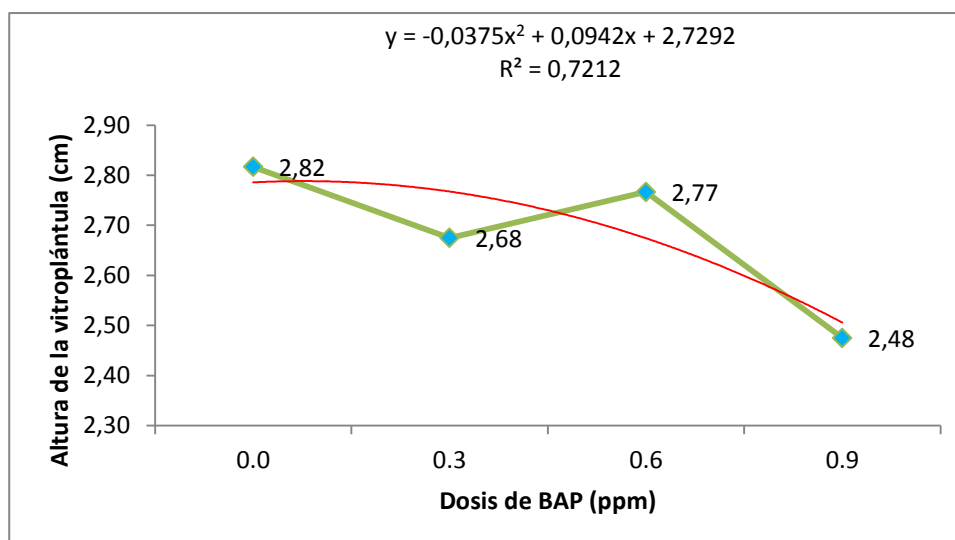
Código	Concentración de IBA (ppm)	Longitud del brote (cm)
<b>b0</b>	0.0	2.82 a
<b>b2</b>	0.6	2.77 a
<b>b1</b>	0.3	2.68 a b
<b>b3</b>	0.9	2.48 b

Para el factor Dosis de BAP (Cuadro 35 y Gráfico 14) se detecta dos rangos de significancia estadística encabezando el primer rango con la mayor respuesta para b0 (0.0 ppm BAP) con un promedio de 2.82 cm de altura del brote; en tanto que, en el segundo rango con la menor respuesta se obtuvo la dosis b3 (0.9 ppm BA) con un promedio de 2.48 cm de altura del brote

Los resultados obtenidos confirman lo manifestado por Ruzic et al. (2000), Pérez-Tornero y Burgos (2000), quienes señalan que las concentraciones se deberían reducir, según la especie o cultivar,



como también señalan para lograr mayor número de brotes y, como se mostrará adelante, sin embargo dosis relativamente altas inhiben el crecimiento, lo que coincide con lo planteado por Vázquez y Torres (1995), lo mencionado también concuerda con lo aludido por (Sánchez *et al.* 2002, Rodríguez *et al.* 2003, Sotolongo *et al.* 2003), quienes ratifican que en varias especies se ha comprobado que a medida que aumenta la concentración de BAP se aprecia una disminución en la longitud de los brotes.



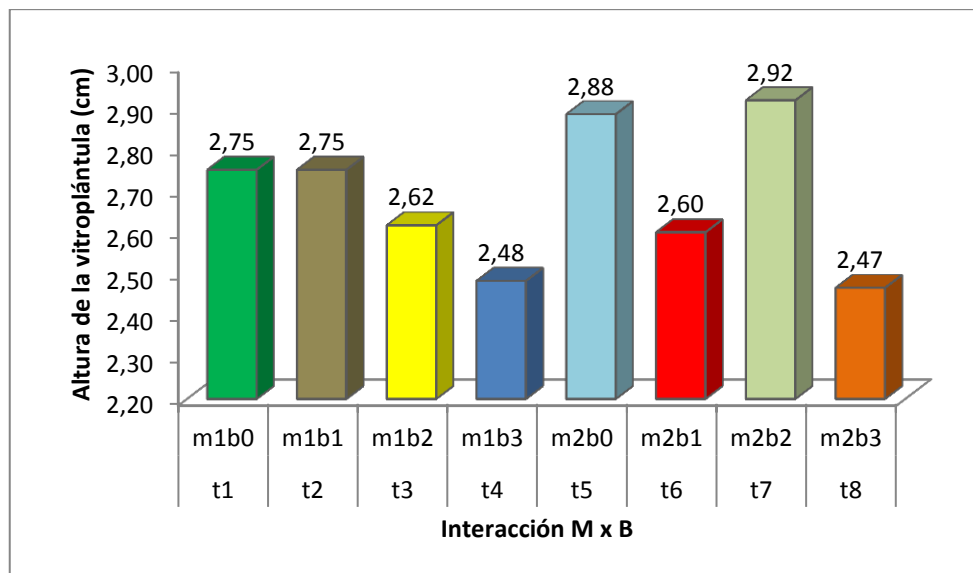
**Gráfico 14.** Promedios de la evaluación de dosis de BAP en la variable altura del brote, formadas para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Al analizar la ecuación de la regresión (Gráfico 14), se determina que a una dosis de 0.0 ppm de BAP se obtiene una altura del brote que puede llegar hasta 2.73 cm de altura por explante, en tanto que, cuando la dosis se incrementa su altura tiende a disminuir como se presenta en la gráfica. El coeficiente de determinación calculado fue de 72 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones, presumiblemente porque los niveles fitohormonales endógenos, producen la cantidad de citocinina necesarios para la planta, sin producir efectos en la elongación del tallo al adicionar cantidades extras de citocinina, (Krikorian, 1991).

**Cuadro 36.** Tukey al 5% para la variable altura del brote, en la evaluación de la interacción MxB para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacción M x I	Longitud del brote (cm)
<b>m1b2</b>	MS½; 0.6 de BAP	2.92 a
<b>m2b0</b>	N6; 0.0 de BAP	2.88 a b
<b>m1b0</b>	MS½; 0.0 de BAP	2.75 a b
<b>m1b1</b>	MS½; 0.3 de BAP	2.75 a b
<b>m2b2</b>	N6; 0.6 de BAP	2.62 a b
<b>m2b1</b>	N6; 0.3 de BAP	2.60 a b
<b>m1b3</b>	MS½; 0.9 de BAP	2.48 a b
<b>m2b3</b>	N6; 0.9 de BAP	2.47 b

Tukey al 5% para la interacción M x B (Cuadro 36 y Gráfico 15) detecta dos rangos de significancia, ubicándose en primer rango identifica al medio m1d2 (MS/2; 0,6 ppm de BAP) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 2.92 cm de altura, en tanto que, en el segundo rango con el menor promedio se identifica al medio m2d3 (N6; 0,9 ppm de BAP) con un promedio de 2.47 cm de altura del brote



**Gráfico 15.** Promedio de altura del brote en la evaluación de la interacción MXB la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

### 4.3. Tercera Fase: Enraizamiento

#### 4.3.1 Porcentaje de explantes enraizados

El Análisis de Varianza para la variable porcentaje de explantes enraizados del brote (Cuadro 37), se detectó alta significancia estadística para dosis de ácido indol butírico (I) y para su efecto lineal; y significancia estadística para medios de cultivo y para la interacción M x I. El promedio general del experimento fue de 64.25 por ciento de explantes enraizados. El coeficiente de variación fue de 24.30% valor que demuestra que para este tipo de experimento es bueno.

**Cuadro 37.** Análisis de la varianza para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	S.C	Gl	C.M.	F
Total	21199,000	47		
medios_cultivo	1200,000	1	1200,000	4,92 *
dosis_IBA	9841,500	3	3280,500	13,45 **
lineal	7326,15	1	7326,15	30,15 *
cuadrática	2352,00	1	2352,00	9,65 *
cúbica	163,35	1	163,35	0,67 ns
medios_cultivo * dosis_IBA	406,500	3	135,500	0,56 ns
Error	9751,000	40	243,775	
Promedio	64.25 % de enraizamiento			
Coficiente de variación	24.30 %			
R <sup>2</sup>	0.54			

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 7), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor *p* de 0.738, que determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de *p* de 0.106 que no es significativo asumiendo que hay una homogeneidad entre varianzas de los tratamientos empleados.

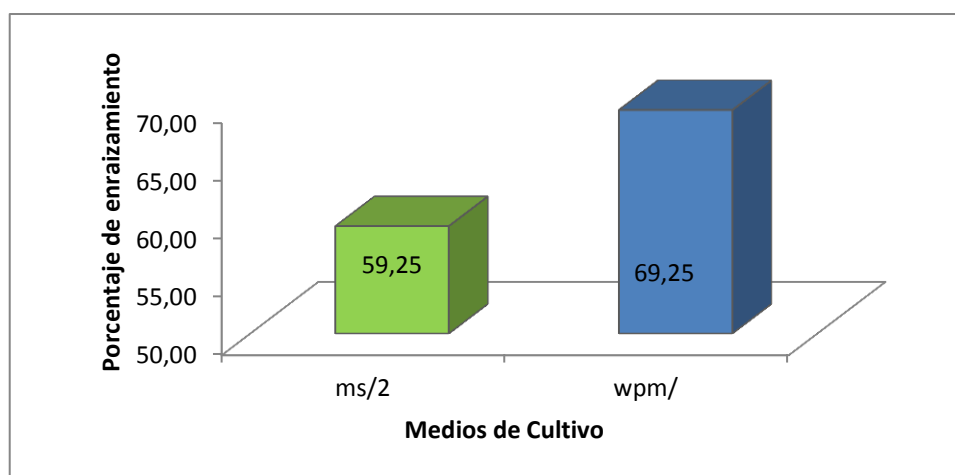
**Cuadro 38.** DMS al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Porcentaje de explantes enraizados (%)
<b>m2</b>	(WPM½)	69,25 a
<b>m1</b>	(MS ½)	59,25 b

La prueba de DMS al 5% para el factor medios de cultivo (Cuadro 38 y Gráfico 16) identifica al medio m2 (WPM½) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 69.25 porciento de explantes enraizados; en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m1 (MS½) con un promedio de 59.25 porciento de explantes enraizados.

Los resultados presentados indican que el medio a la mitad de las concentraciones son adecuados para el enraizamiento los resultados son similares a los resultados mencionados por Khosh-Khui y Sink (1982), indicando que el medio con la mitad de sus minerales y suplementado con ANA en una concentración 0.05 mg/L, es adecuado para inducir el enraizamiento, llegando a obtener una estimulación a los indicios de raíces, además Arnold et al. (1995), concuerda con los autores anteriores, y dice que el medio de cultivo suplementado con bajas concentraciones de auxinas, independiente de cuál sea, o sin suplemento de esta, presenta un buen porcentaje de enraizamiento, obteniendo un 95% en el mejor de los casos, Según Hasegawa (1980), el medio MS suplementado con 0,1 a 0,5 mg/L de auxina (ANA, AIA o AIB), no debería presentar dificultades para el

enraizamiento del explante, según manifiestado por Drew (1987), quien al reducir la concentración mineral del medio de enraizamiento para *Carica papaya L.* logró aumentar el número de raíces y la velocidad de iniciación de éstas. De la misma manera, Travers, Starbuck y Natarella (1985) al evaluar el efecto del medio de enraizamiento sobre el portainjerto de manzano Antonovka 313, encontraron que reduciendo las concentraciones de los macronutrientes y micronutrientes a un cuarto y a la mitad de su concentración, respectivamente, y adicionando al medio 0,25  $\mu\text{M}$  de AIB más 1 g/L de carbón activado, se lograron buenos porcentajes de enraizamiento, la dificultad que presentan las especies de *Prunus* para enraizar in vitro, y que ha obligado a los investigadores a colocar los explantes por 3 ó 5 días en medio para enraizamiento para luego transferirlos a medio sin auxinas (Espinosa et al., 2006; Channuntapipat et al., 2003). En el presente trabajo el enraizamiento se llevó a cabo sin cambiar de medio a los explantes.

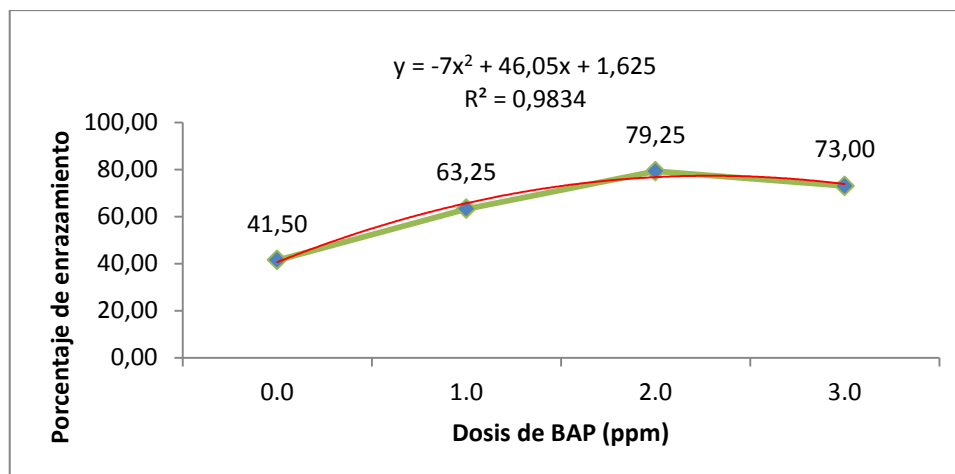


**Gráfico 16.** Promedio para la evaluación de medios de cultivo en la variable porcentaje de explantes enraizados, para la micropropagación de *Capulí (Prunus serotina spp capuli)*. Quito, Pichincha. 2014.

**Cuadro 39.** Tukey al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación in vitro de *Capulí (Prunus serotina ssp capuli)*. Quito, Pichincha. 2014.

Código	Concentración de IBA (ppm)	Porcentaje de explantes enraizados
i2	2	79.25 a
i3	3	73.00 a
i1	1	63.25 a
i0	0	41.50 b

Tukey al 5% para el factor Dosis de IBA (Cuadro 39 y Gráfico 17), detecta dos rangos de significancia estadística encabezando el primer rango con la mayor respuesta para i2 (2 ppm IBA) con un promedio de 79.25 porciento de explantes enraizados; en tanto que, al final del rango con la menor respuesta se obtuvo la dosis i0 (0 ppm IBA) con un promedio de 41.50 porciento de explantes enraizados.



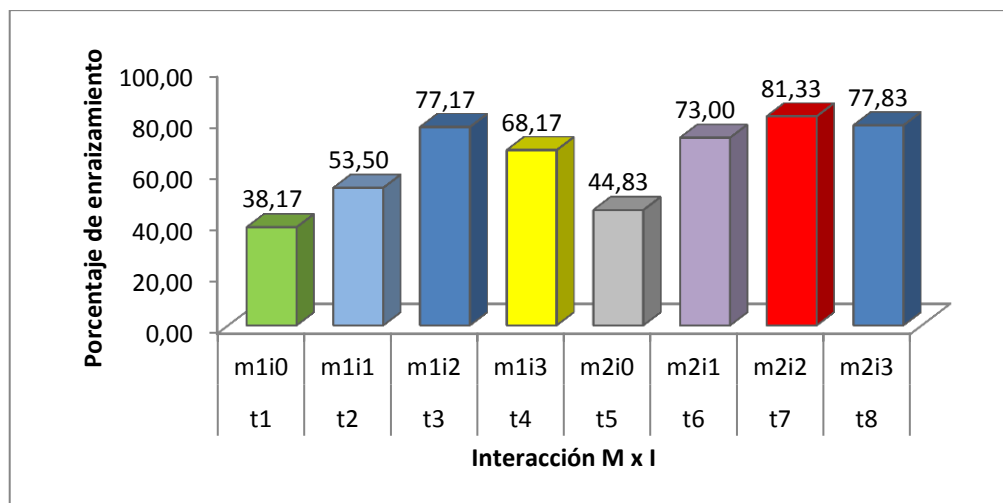
**Gráfico 17.** Promedio para la evaluación de dosis de IBA en la variable porcentaje de explantes enraizados, formados para la micropropagación in vitro de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Al determinar la ecuación de la regresión (Gráfico 17), se determina que a una dosis de 2.5 ppm de IBA se obtiene un número alto del porcentaje de explantes enraizados llegando a obtenerse de 73.00% de explantes enraizados, en tanto que, cuando la dosis se incrementa, el porcentaje tiende a disminuir puesto que se empieza a desarrollarse callosidades. El coeficiente de determinación calculado fue de 98 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones.

**Cuadro 40.** Tukey al 5% para la variable porcentaje de explantes enraizados, en la evaluación de la interacción M x I para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacción M x I	Porcentaje de explantes enraizados
<b>m2i2</b>	WPM <sup>1/2</sup> ; 2 ppm de IBA	81.33 a
<b>m2i3</b>	WPM <sup>1/2</sup> ; 3 ppm de IBA	77.83 a
<b>m1i2</b>	MS <sup>1/2</sup> ; 2 ppm de IBA	77.17 a
<b>m2i1</b>	WPM <sup>1/2</sup> ; 1 ppm de IBA	73.00 a b
<b>m1i3</b>	MS <sup>1/2</sup> ; 3 ppm de IBA	68.17 a b
<b>m1i1</b>	MS <sup>1/2</sup> ; 1 ppm de IBA	53.50 a b c
<b>m2i0</b>	WPM <sup>1/2</sup> ; 0 ppm de IBA	44.83 b c
<b>m1i0</b>	MS <sup>1/2</sup> ; 0 ppm de IBA	38.17 c

Las interacciones M x I (Medios de cultivo x Concentraciones de IBA), Cuadro 40 y Gráfico 18 se observa que las interacciones m1i2 (WPM<sup>1/2</sup>; 2 ppm de IBA) presenta la mejor respuesta con 81.33 por ciento de explantes, en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m1i0 (MS<sup>1/2</sup>; 0,0 ppm de IBA) con un promedio de 38.17 porciento de explantes enraizados



**Gráfico 18.** Promedio de porcentaje de explantes enraizados formados en la evaluación de la interacción MXI la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

#### 4.2.1 Longitud de raíces

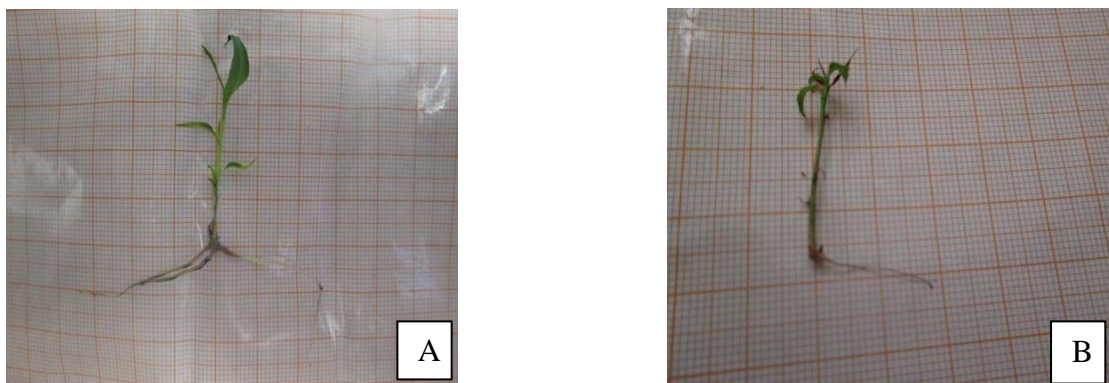
El Análisis de Varianza para la variable longitud de la raíz (Cuadro 41) se detectó, significancia para dosis de Ácido indol butírico (I) así como para el efecto lineal, y no existió significancia estadística para medios de cultivos (M) y para la interacción M x I. El promedio general del experimento fue de 14.71 mm de longitud de la raíz. El coeficiente de variación fue de 27.85 % valor que demuestra que para este tipo de experimento es muy bueno

**Cuadro 41.** Análisis de la varianza para la variable longitud de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	S.C.	Gl	C.M.	F
Total	803,920	47		
medios_cultivo	10,083	1	10,083	0,601 ns
dosis_BAP	110,750	3	36,917	2,200 ns
Lineal	106,67	1	106,67	6,36 *
cuadrático	0,33	1	0,33	0,02 ns
Cúbico	3,75	1	3,75	0,22 ns
medios_cultivo * dosis_BAP	11,750	3	3,917	0,233 ns
Error	671,333	40	16,783	
Promedio	14.71 mm de longitud			
Coeficiente de variación	27.85 %			
R <sup>2</sup>	0.16			

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 8), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor *p* de 0.324, que

determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de  $p$  de 0.358 que no es significativo asumiendo que hay una homogeneidad entre varianzas de los tratamientos empleados.



Fotografía 5. (A) Longitud de la raíz en N6. (B) Longitud de la raíz en MS1/2

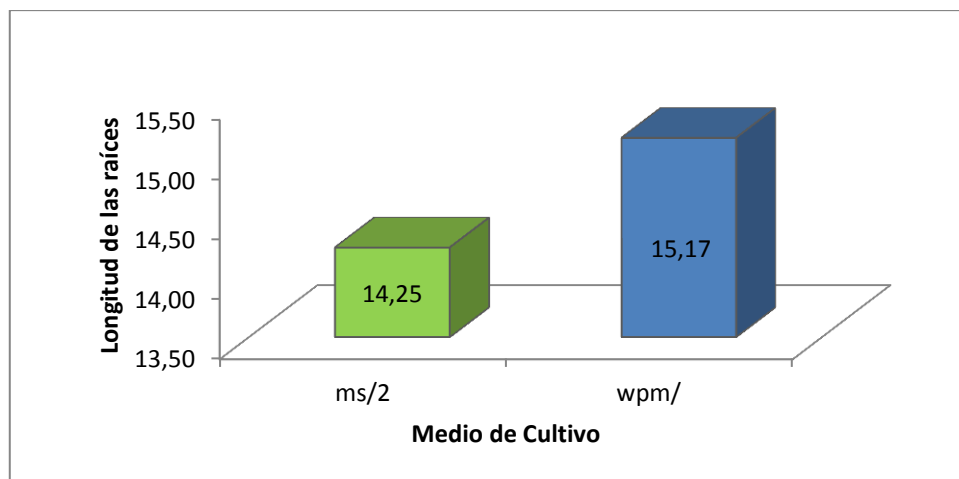
**Cuadro 42.** Promedios para la variable longitud de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Longitud de la raíz (mm)
<b>m2</b>	(WPM ½)	15.17
<b>m1</b>	(MS ½)	14.25

El cuadro de promedios para el factor medios de cultivo (Cuadro 42 y Gráfico 19) identifica al medio m2 (WPM ½) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 15.25 mm de longitud de la raíz; en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m1 (MS½) con un promedio de 14.25 mm de longitud de la raíz.

Los resultados obtenidos coincide por propuesto por Dimassi-Theriou (1995), quienes afirman que al reducir la concentración del medio se obtuvo un aumento significativo en la longitud promedio de las raíces, en cambio Dal Zotto y Docampo (1997) en plantas del portainjerto Mariana 2624, enraizadas en el mismo medio obtuvieron raíces con una longitud promedio de 60 mm, sin embargo la reducción de los minerales en medio puede ser realizarse hasta niveles muy bajos para la fase de enraizamiento.

En este ensayo, se aprecia que la menor longitud de raíces fue de 14.25 mm, utilizando como medio de enraizamiento el medio MS½ más 2 ppm IBA, esto deja claro que las especies vegetales no responden de igual manera a las mismas condiciones, aunque pertenezcan al mismo género.



**Gráfico 19.** Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable longitud de raíces, para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Cuadro 43.** Promedio para la variable longitud de raíces, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

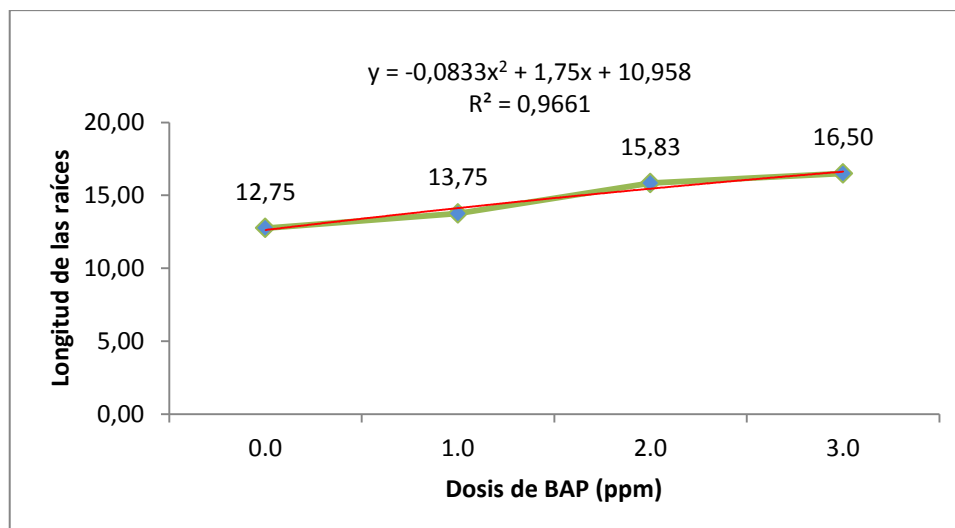
Código	Concentración de IBA (ppm)	Longitud de la raíz (mm)
i3	3	16.50
i2	2	15.83
i1	1	13.75
i0	0	12.75

Para el factor Dosis de IBA (Cuadro 43 y Gráfico 20) se detecta dos rangos de significancia estadística encabezando el primer rango con la mayor respuesta para i3 (3 ppm IBA) con un promedio de 16.50 mm de longitud de la raíz; en tanto que, en el segundo rango con la menor respuesta se obtuvo la dosis i0 (0 ppm IBA) con un promedio de 12.75 mm de longitud de la raíz

Los análisis de los resultados del presente estudio mostraron la necesidad y suficiencia del suplemento auxínico para inducir buenos porcentajes de enraizamiento, adecuado número de raíces por explante y la proporcionalidad entre el número de raíces producidas y la concentración de ANA

Es recomendable utilizar bajas concentraciones mínimas de BAP puede ser utilizado para darle más vigor a la plántula, según Chávez, *et al* (2007) en *Fuchsia magellanica*, BAP tiene algún efecto beneficioso sobre las raíces cuando se combinan con IBA.





**Gráfico 20.** Promedios de la evaluación de dosis de IBA en la variable longitud de raíces para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Al analizar la ecuación de la regresión (Gráfico 20), se determina que a una dosis de 2.5 ppm de IBA obteniéndose una longitud de 14.84 mm de longitud de las raíces, en tanto que, cuando la dosis se incrementa, el número tiende a disminuir debido al efecto inhibitorio de la auxina. El coeficiente de determinación calculado fue de 97 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones.

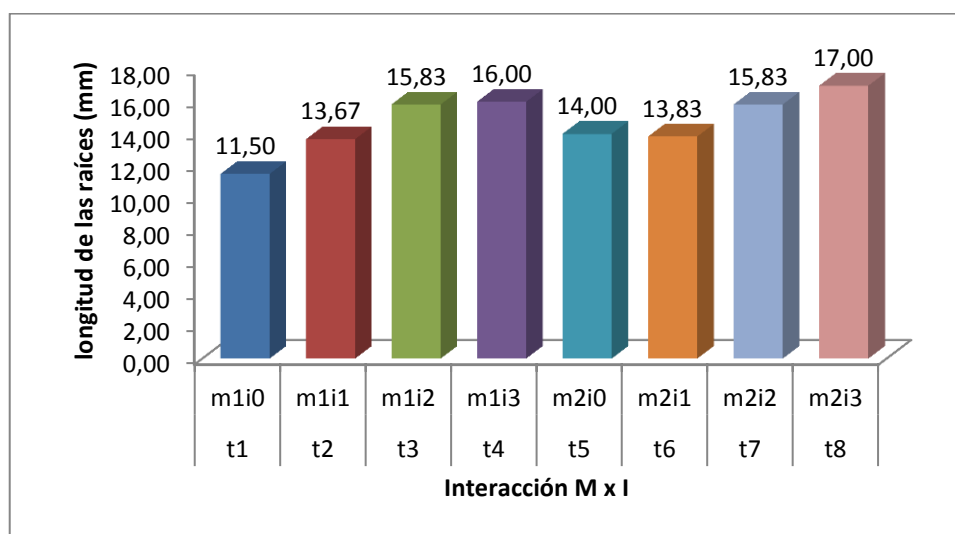
**Cuadro 44.** Promedios para la variable longitud de la raíz, en la evaluación de la interacción MxI para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacción M x I	Longitud de la raíz (mm)
<b>m2i3</b>	WPM½; 3 ppm de IBA	17.00
<b>m1i3</b>	MS½; 3 ppm de IBA	16.00
<b>m1i2</b>	WPM½; 2 ppm de IBA	15.83
<b>m2i2</b>	WPM½; 2 ppm de IBA	15.83
<b>m2i0</b>	WPM½; 0 ppm de IBA	14.00
<b>m2i1</b>	WPM½; 1 ppm de IBA	13.83
<b>m1i1</b>	MS½; 1 ppm de IBA	13.67
<b>m1i0</b>	MS½; 0 ppm de IBA	11.50

Promedio para la interacción M x I (Cuadro 44 y Gráfico 21) se observa que la mejor respuesta se presenta en la interacción m2i3 (WPM½; 3 ppm de IBA) con un promedio de 17.00 mm de longitud de la raíz; en tanto que, con la menor respuesta se ubica la interacción m2i0 (MS½; 0 ppm de IBA) con un promedio de 11.50 mm de longitud de la raíz

Se sabe que las altas concentraciones de auxinas resultan tóxicas para los tejidos vegetales, especialmente IBA, puesto que en estudios realizados se ha comprobado que esta auxina en su forma libre, pueden incrementar la biosíntesis de la producción de etileno, un compuesto muy conocido por su efecto de causar senescencia de los tejidos (Gaviniertvatana *et al.*, 1982).

Por otro lado la presencia de citoquininas en el medio de enraizamiento generalmente inhibe o retarda la formación de raíces así como también previene el crecimiento de las raíces y puede inhibir el efecto de las auxinas como indicadores del enraizamiento (Humphries, 1960)



**Gráfico 21.** Promedio de la longitud de raíces en la evaluación de la interacción MXI la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

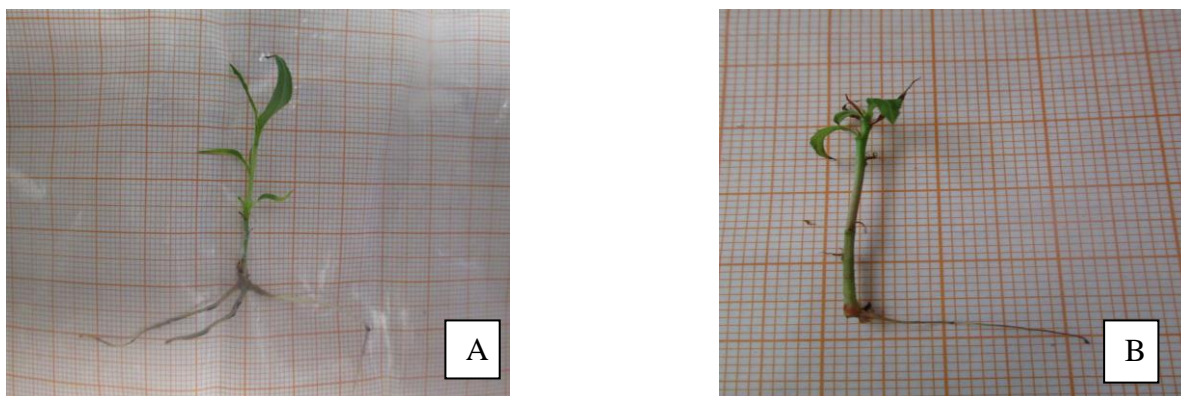
#### 4.3.3. Número de raíces

El Análisis de Varianza para la variable número de raíces (Cuadro 45) se detectó, significancia estadística para dosis de Ácido indol butírico (I), no significancia estadística para el factor de medios de cultivo (M) y para la interacción M x I. El promedio general del experimento fue de 3.32 raíces por vitroplántula. El coeficiente de variación fue de 10,25% valor que demuestra que para este tipo de experimento es excelente lo que avala que se realizó en condiciones homogéneas.

**Cuadro 45.** Análisis de la varianza para la variable número de raíces, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

F de variación	S.C.	Gl	M.C.	F
Total		47		
medios_cultivo	0,242	1	0,242	2,093 ns
dosis_BAP	3,780	3	1,260	10,886 *
lineal	1,82	1	1,82	15,71 *
Cuadrático	1,80	1	1,80	15,53 *
Cúbico	0,16	1	0,16	1,42 ns
medios_cultivo * dosis_BAP	0,666	3	0,222	1,918 *
Error	4,630	40	,116	
Promedio				
3.32 raíces por vitroplántula				
Coeficiente de variación				
10.25 %				
R <sup>2</sup>				
0.50				

Se comprobó el análisis de distribución normal y de homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene respectivamente (Anexo 9), para los residuos en un diseño experimental paramétrico, en la prueba de K-S se obtiene un valor  $p$  de 0.209, que determina que sus datos se ajustan a la distribución normal, mientras que, la prueba de Levene establece un valor de  $p$  de 0.551 que no es significativo asumiendo que hay una homogeneidad entre varianzas de los tratamientos empleados.



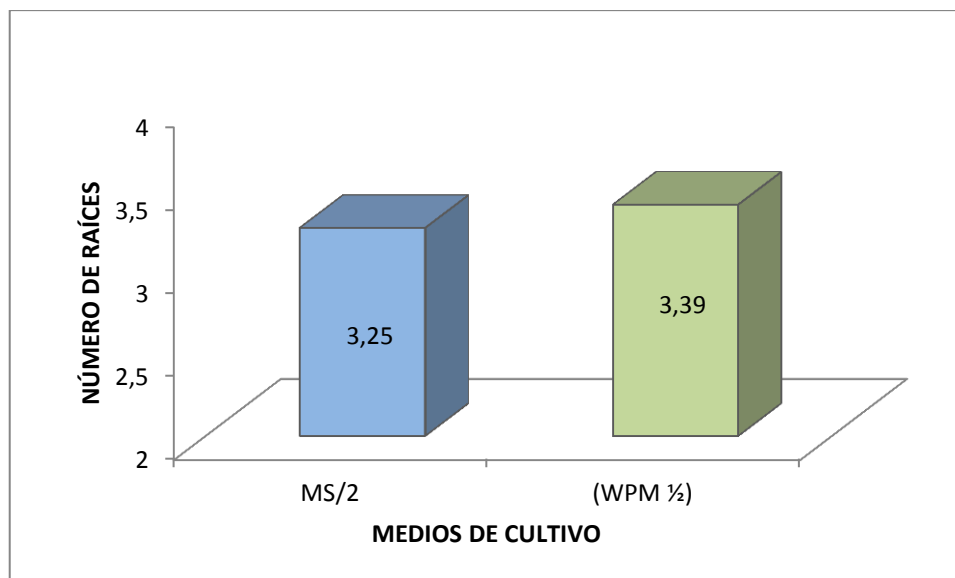
Fotografía 5. (A) Porcentaje de explantes enraizados en WPM $\frac{1}{2}$ . (B) Porcentaje de explantes enraizados en MS $\frac{1}{2}$

**Cuadro 46.** Promedios para la variable raíces por vitroplántula, en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Medios de cultivo	Número de raíces
<b>m2</b>	(WPM $\frac{1}{2}$ )	3.39
<b>m1</b>	(MS $\frac{1}{2}$ )	3.25

El cuadro de promedios para el factor medios de cultivo (Cuadro 46 y Gráfico 22) identifica al medio m2 (WPM $\frac{1}{2}$ ) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 3.39 raíces por vitroplántula; en tanto que, con el menor promedio se identifica al medio m1 (MS $\frac{1}{2}$ ) con un promedio de 3.25 raíces por vitroplántula.

En la propagación *in vitro*, lo importante y preferente es mantener plantas con mayor número de raíces que plantas con raíces de gran longitud, debido que al mantener un mayor número de raíces la planta tiene una mayor superficie de absorción y al momento de aclimatar a la vitroplanta, según Cáceres, (2004) en su investigación en *Prunus avium* y *Prunus cerasus* manifiesta que, la concentración de los componentes minerales reducida a la mitad más 1 mg/L de AIB, de esta manera se logró obtener en promedio 4,2 raíces por vitroplanta resultados que se ajustan a al ensayo realizado



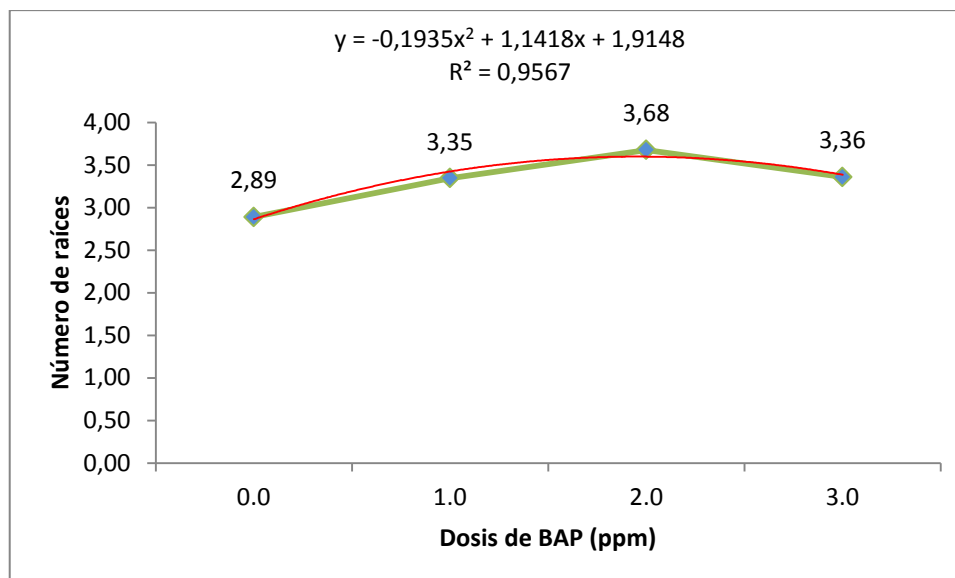
**Gráfico 22.** Promedios de la evaluación de medios de cultivo en la variable raíces por vitroplántula, para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

**Cuadro 47.** Tukey al 5% para la variable raíces por vitroplántula, en la evaluación de dosis de IBA para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Concentraciones de IBA	raíces por vitroplántula
i2	2.0 ppm	3.58 a
i3	3.0 ppm	3.35 a
i1	1.0 ppm	3.36 a
i0	0.0 ppm	2.75 b

La prueba de Tukey al 5% para la dosis de IBA (Cuadro 47 y Gráfico 23) se ubica con la mejor respuesta a la dosis i2 (2.0 ppm IBA) con un promedio de 3.58 raíces por vitroplántula; en tanto que, en el segundo rango con la menor respuesta se obtuvo la dosis i0 ( ppm IBA) con un promedio de 2.89 raíces por vitroplántula

El resultado anteriormente descrito se apoya en lo conseguido por DREW (1987), quien al reducir la concentración mineral del medio de enraizamiento para *Carica papaya L.* logró aumentar el número de raíces y la velocidad de iniciación de éstas. De la misma manera, Travers, Starbuck y Natarella (1985) al evaluar el efecto del medio de enraizamiento sobre el portainjerto de manzano Antonovka 313, encontraron que reduciendo las concentraciones de los macronutrientes y micronutrientes a un cuarto y a la mitad de su concentración, respectivamente, y adicionando al medio 0,25 µM de AIB más 1 g/L de carbón activado, se lograron buenos porcentajes de enraizamiento.



**Gráfico 23.** Promedios de la evaluación de dosis de IBA en la variable raíces por vitroplántula, formadas para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Al determinar la ecuación de la regresión (Gráfico 23), se determina que a una dosis de 2.5 ppm de IBA se obtiene un alto raíces por vitroplántula llegando a obtener de 3.57 raíces por vitroplántula, en tanto que, cuando la dosis se incrementa, el número tiende a disminuir por las formaciones de callosidades. El coeficiente de determinación calculado fue de 96 % lo que fortalece la aseveración indicada anteriormente que es un modelo confiable para realizar predicciones.

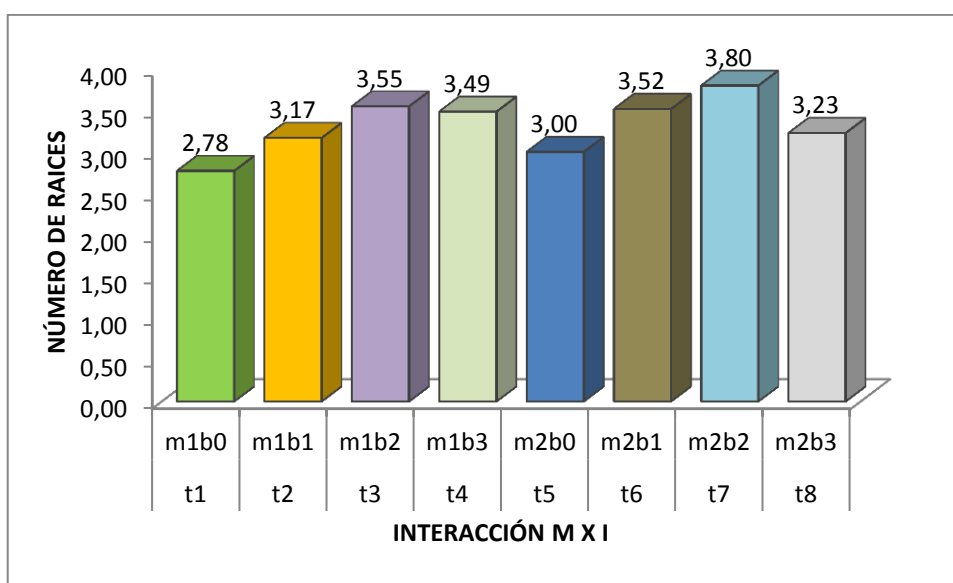
La formación de raíces adventicias en explantes sin la suplementación externa de IBA, se supone que los explantes de capulí contienen niveles endógenos de auxina que les permitió formar raíces adventicias, demostrando lo propuesto por Elliot *et al.*, (1994) quienes publican que las concentraciones endógenas de auxina provocan muchas respuestas idénticas que con auxinas exógenas. Sin embargo la presencia de bajas concentraciones de ANA se llega a obtener significativo número de raicillas.

**Cuadro 48.** Tukey al 5% para la variable raíces por vitroplántula, en la evaluación de la interacción MxI para la micropropagación de *Capulí* (*Prunus serotina ssp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

Código	Interacciones M x I	Número de raíces
<b>m2i2</b>	WPM1/2; 2 ppm de IBA	3.67 a
<b>m2i1</b>	WPM1/2; 1 ppm de IBA	3.50 a b
<b>m1i2</b>	MS½; 2 ppm de IBA	3.50 a b
<b>m1i3</b>	MS½; 3 ppm de IBA	3.50 a b
<b>m2i3</b>	WPM½; 3 ppm de IBA	3.17 a b c
<b>m1i1</b>	MS½; 1 ppm de IBA	3.17 b c
<b>m2i0</b>	WPM½; 0 ppm de IBA	3.00 b c
<b>m1i0</b>	MS½; 0 ppm de IBA	2.50 c

Tukey al 5% para la interacción M x I (Cuadro 48 y Gráfico 24) detecta dos rangos de significancia, ubicándose en primer rango identifica al medio m2i2 (WPM1/2; 2 ppm de IBA) que alcanza la mejor respuesta con un promedio de 3,67 raíces por vitroplántula, en tanto que, en el segundo rango con el menor promedio se identifica al medio m1i0 (MS½; 0 ppm de IBA) con un promedio de 2,50 raíces por vitroplántula

De lo expuesto por Dal Zotto y Docampo, (1997) pone de manifiesto que la respuesta a un determinado número de raíces depende en gran medida de la especie y de la variedad, ya que se obtuvo la misma respuesta, pero con una distinta o casi nula dosificación de niveles de auxinas. Efectos similares de se ha encontrado en ANA para el enraizamiento in vitro de varias especies leñosas y herbáceas tales como *Prunus fruticosa* y *Prunus tormentosa* (Pruski *et al.*, 2003), *Decalepis arayalpatra* (Sudha *et al.*, 2005), *Stevia rebaudiana* (Suárez *et al.*, 2005), *Viburnum odoratissimum* (Schoene y Yeager, 2005) y *Elaeagnus angustifolia* (Iriondo *et al.*, 1995)



**Gráfico 24.** Promedio para el número de raíces en la evaluación de la interacción M X I la micropropagación de Capulí (*Prunus serotina spp capuli*). Quito, Pichincha. 2014.

#### 4.4. COSTOS DEL EXPERIMENTO

##### 4.4.1 Análisis económico para la etapa de desinfección

El análisis económico (Cuadro 49) para la desinfección de los explantes de capulí, se realizó para la producción de 1m², utilizando el método de Perrín presupuesto parcial del CIMMYT (1988), tomando en cuenta los tratamientos que resultaron favorables en esta investigación, cuenta rubros tales como, medios de cultivo, mano de obra sueldo básico, insumos, materiales y alquiler de un laboratorio con los equipos e infraestructura necesaria para desarrollar este proceso de investigación, el precio a la venta al público es de 1.04 USD

**Cuadro 49** Costos que varían y beneficios netos para la desinfección in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m <sup>2</sup>	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m <sup>2</sup>	C.q.V. usd/m <sup>2</sup>	B.N. usd
t1	2.304,00	2.073,60	2.156,54	1570,75	585,79
t2	2.074,00	1.866,60	1.941,26	1413,95	527,31
t3	2.028,00	1.825,20	1.898,21	1546,86	351,35
t4	1.981,00	1.782,90	1.854,22	1511,01	343,21
t5	1.935,00	1.741,50	1.811,16	1632,66	178,50
t6	1.889,00	1.700,10	1.768,10	1593,84	174,26

En el cuadro 50 se muestran los tratamientos de mayor tasa de retorno destacándose como el mejor tratamiento t1 (10% de NaClO; 5 minutos), el costo del tratamiento fue de 1570.70 USD por m<sup>2</sup> cuadrado y generó un beneficio neto de 585.70 por m<sup>2</sup> por cual incluye una tasa de retorno marginal de 37.29% siendo económicamente el tratamiento más rentable que se hace referencia solo al costo que varia para esta investigación.

**Cuadro 50** Tasa de retorno marginal para la desinfección in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m <sup>2</sup>	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m <sup>2</sup>	C.q.V. usd/m <sup>2</sup>	B.N. usd	C.Q.V. marginal	B.N. marginal	TAMIR
t2	2.074,00	1.866,60	1.941,2	1413,9	527,3			
t1	2.304,00	2.073,60	2.156,5	1570,7	585,7	156,80	58,48	37,29

#### 4.4.2 Análisis económico para la fase de brotación

El análisis económico en la fase de brotación se tomaron en cuenta rubros tales como, medios de cultivo, mano de obra sueldo básico, insumos, materiales y equipos de laboratorio e infraestructura necesaria para desarrollar este proceso de investigación.

En esta fase se consideró los medios de cultivo utilizados, las concentraciones de BAP, en el cuadro 51 se puede observar los tratamientos estudiados con sus rendimientos por planta por m<sup>2</sup>, el rendimiento ajustado al 10%, beneficio bruto, costos que varían, el beneficio neto; el valor de la planta en esta fase es de 1.50 USD

**Cuadro 51** Costos que varían y beneficios netos para la fase de brotación in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m <sup>2</sup>	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m <sup>2</sup>	C.q.V. usd/m <sup>2</sup>	B.N. usd
<b>t1</b>	256	230	346	277	69
<b>t2</b>	251	226	339	273	66
<b>t3</b>	247	222	333	270	64
<b>t4</b>	241	217	325	264	61
<b>t5</b>	238	214	321	193	128
<b>t6</b>	240	216	324	196	128
<b>t7</b>	239	215	323	196	126
<b>t8</b>	242	218	327	200	126

En el cuadro 52 se muestran los tratamientos de mayor tasa de retorno destacándose como el mejor tratamiento t2 (N6; 0.0 ppm de BAP), es costo del tratamiento fue de 339 USD por m<sup>2</sup> cuadrado y generó un beneficio neto de 66.00 USD por m<sup>2</sup> por cual incluye una tasa de retorno marginal del 100% siendo económicamente el tratamiento más rentable para esta fase.

**Cuadro 52** Tasa de retorno marginal para la fase de brotación in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m <sup>2</sup>	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m <sup>2</sup>	C.q.V. usd/m <sup>2</sup>	B.N. usd	C.Q.V. marginal	B.N. marginal	TAMIR
<b>t4</b>	241	217	325	264	61			
<b>t3</b>	247	222	333	270	64	5	3	54,25
<b>t2</b>	251	226	339	273	66	3	3	<b>100,00</b>

#### 4.4.1 Análisis económico para la etapa de enraizamiento

El análisis económico (Cuadro 53) para la desinfección de los explantes de capulí, se realizó para la producción de 1m<sup>2</sup>, utilizando el método de Perrín presupuesto parcial del CIMMYT (1988), tomando en cuenta los tratamientos que resultaron favorables en esta investigación, cuenta rubros tales como, medios de cultivo, mano de obra sueldo básico, insumos, materiales y alquiler de un laboratorio con los equipos e infraestructura necesaria para desarrollar este proceso de investigación, el precio a la venta al público es de 1.50 USD



**Cuadro 53** Costos que varían y beneficios netos para la fase de enraizamiento in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m2	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m2	C.q.V. usd/m2	B.N. usd
<b>t1</b>	234	211	316	261	55
<b>t2</b>	236	212	319	263	55
<b>t3</b>	247	222	333	276	58
<b>t4</b>	241	217	325	270	56
<b>t5</b>	256	230	346	217	129
<b>t6</b>	251	226	339	213	126
<b>t7</b>	239	215	323	203	120
<b>t8</b>	242	218	327	206	121

En el cuadro 54 se muestran los tratamientos de mayor tasa de retorno destacándose como el mejor tratamiento t5 (WPM/2; 2 ppm de IBA), es costo del tratamiento fue de 217.00 USD por m<sup>2</sup> cuadrado y generó un beneficio neto de 129.00 por m<sup>2</sup> por cual incluye una tasa de retorno marginal de 87.49% siendo económicamente el tratamiento más rentable para esta fase de la investigación

**Cuadro 54** Tasa de retorno marginal para la fase de enraizamiento in vitro de capulí apartir de segmentos nodales.

Tratamiento	Rendimiento plantas/m2	Rendimiento ajustado al 10%	B.B. usd/m2	C.q.V. usd/m2	B.N. usd	C.Q.V. marginal	B.N. marginal	TAMIR
<b>t8</b>	242	218	327	206	121	3	1	46,59
<b>t6</b>	251	226	339	213	126	8	5	59,91
<b>t5</b>	256	230	346	217	129	4	3	<b>87,49</b>

## 5. CONCLUSIONES

- El método óptimo para la desinfección de los explantes es el tratamiento t1 (NaClO al 10%; 5 minutos de inmersión), presentándose 93.75% en la viabilidad de los explantes y para los explantes libres de contaminación presenta un 87.50% en la fase de establecimiento del cultivo, ya que es el tratamiento que no generó contaminación ni daños en los tejidos de yemas.
- El medio de cultivo Murashige y Skoog a la mitad de concentración de sales (MS<sup>1</sup>/2) resultó ser el medio que determinó el menor tiempo a la aparición de los brotes obteniendo 11.35 días para la formación de brotes de Capulí (*Prunus serotina ssp capuli*)
- El tesigo en la aplicación de 6-Bencilaminopurina (6-BAP), tuvo un efecto sobre el tiempo para la formación de brotes, obteniéndose un promedio de 9.50 días a la brotación, mientras que todas las dosis empleadas de BAP tuvieron efectos similares en las variables
- El medio de cultivo Woody Plant Medium a la mitad de la concentración de sales (WPM 1/2) resultó ser el medio óptimo para la etapa de brotación obteniéndose mayor número de raíces por vitroplántula
- La dosis de ácido indolbutírico (IBA) suplementado con 2 ppm semisólido, con 40 g de sacarosa, una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) fue la dosis con altos porcentajes de enraizamiento de 69.25% de explantes enraizados e incremento en el número de raíces con un promedio de 3.32 raíces por vitroplántula en la fase de enraizamiento
- De acuerdo al análisis económico para el proceso de desinfección in vitro, el tratamiento t1: (10% NaClO; 5 minutos) presentó el costo más rentable donde se obtuvo una Tasa de Retorno Marginal de 37.29%, en la fase de enraizamiento el medio de cultivo más rentable fue t5 (WPM/2; 2 ppm BAP) puesto que permitió obtener una Tasa de Retorno Marginal de 87.49%.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Para la desinfección de explantes utilizar NaClO al 10% por 5 minutos de inmersión al igual que la utilización de los biocidas, puesto que controla la contaminación y no daña los tejidos, permitiendo una viabilidad de los mismos, además que genera una Tasa de Marginal de Retorno alta
- Para la fase de brotación in vitro se recomienda utilizar el medio MS ½ a la mitad de las concentraciones sin la aplicación de 6-bencilaminopurina (BAP) debido a que este medio promueve el desarrollo de varios brotes.
- Para la fase de enraizamiento se recomienda utilizar el medio WPM ½ a la mitad de las concentraciones semisólido, con 40 g de sacarosa, con una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) y suplementado con 2 ppm de ácido indolbutírico (IBA) debido a que, esta técnica permite obtener vitroplantúlas en menor tiempo y con un número mayor de raíces.
- Continuar con las investigaciones sobre el sistema in vitro, de especies frutales nativas, basándose en los procesos de desinfección de material vegetal.

## 7. RESUMEN

El capulí es una especie que crece en los valles interandinos con una enorme potencialidad para poblar zonas áridas, semiáridas y lugares que ha sido afectadas por explotaciones mineras a demás de contribuir con la ornamentación urbana, a nivel mundial y en el país se observa la erosión genética, por lo que es necesario realizar de iniciativas que promuevan su conservación, siendo una alternativa el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

El presente trabajo consistió en micropropagar brotes de capulí a partir de segmentos nodales la investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central del Ecuador, evaluando para la primera fase se obtuvo material vegetal a partir de plantas madres que consistió en esquejes (explantes) de capulí chaucha, se procedió al lavado y desinfección, se realizó con abundante agua potable durante dos minutos, luego se preparó la disolución de Savlón (Clorhexidina 1.5% - Cetrimide 15%) más Povidyn (Yodo povidona solución u.s.p 10% y 1% de yodo disponible), la desinfección consistió en sumergir los segmentos en tres concentraciones de hipoclorito de sodio (10%, 15% y 20 %) en dos tiempos de inmersión (5 y 10 minutos) en el medio de cultivo MS ½,

Para el establecimiento de los explantes en la fase de brotación se colocaron los explantes papel absorbente esterilizado y con la ayuda de una pinza y bisturí se reanimó el tejido cortando las partes oxidadas, se colocó en los medios para brotación MS ½ y N6 donde se evaluó cuatro dosis de BAP (0.0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm BAP), se selló los frascos y etiquetó el material se transfirió al cuarto de cultivo. Al culminar este período se procedió con la toma de datos de las variables: Días a labrotación, Número de brotes /explante y Longitud de brote/explante. La unidad experimental estuvo constituida por un explante portando un par de yemas axilares. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño completamente al azar con seis observaciones.

Para el inicio de la fase de enraizamiento se seleccionó los brotes que presentaba los mejores resultados de la fase anterior se los colocó en el medio para enraizamiento MS ½ y WPM ½ con 40 gramos de sacarosa, 4gramos/litro de agar, 0.25 ppm de Ácido Naftalén Acético (ANA), a diferentes concentraciones de Ácido Indol Butírico (0.0; 1; 2; 3 ppm IBA) se selló los frascos y etiquetó. Las vitroplantas sembradas en este proceso, se transfirieron al cuarto de cultivo, al culminar este período se procedió con la toma de datos de las variables; Porcentaje de enraizamiento, Longitud de la raíz y Número de raíces. La unidad experimental estuvo constituida por dos brotes. El análisis estadístico se realizó utilizando un diseño completamente al azar con seis observaciones.

De los resultados obtenidos se concluye que para la fase de la desinfección de los explantes el mejor tratamiento presentado fue el t1 (NaClO al 10%;5 minutos) en un medio de cultivo MS½ que presentó el menor daño al explante y menor contaminación obteniéndose explantes anéxicos, en la fase de brotación, el medio MS ½ suplementado con 0.0 ppm de 6-bencilaminopurina (BAP) presentó los mejores resultados en para los días a la brotación y para la longitud de los brotes, en la fase para el enraizamiento, el medio WPM ½ semisólido, con 40 g de sacarosa, una base de 0.25 ppm de ácido naftalén acético (ANA) y suplementado con 2 ppm de ácido indolbutírico (IBA) permite obtener plantas en menor tiempo favoreciendo el porcentaje de enraizamiento y la longitud de las raíces. De acuerdo al análisis económico para el proceso de desinfección in vitro, el tratamiento t1: (10% NaClO; 5 minuto) presentó el costo más rentable donde se obtuvo una la Tasa de Retorno Marginal de 37.29%, en la fase de enraizamiento el medio de cultivo mas rentable fue t5 (WPM/2; 2 ppm BAP) puesto que permitió obtener una Tasa de Retorno Marginal de 87.49%.

## SUMMARY

The cherry tree is a species that grows in the valleys with an enormous potential to populate arid, semiarid and places that have been affected by mining to others to contribute to urban ornamentation, global and country erosion is observed genetics, so it is necessary initiatives to promote conservation, being an alternative techniques using plant tissue culture.

This work consisted of micropropagate outbreaks capulí from nodal segments research was developed in the Laboratory of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, Central University of Ecuador, evaluating for the first phase plant material was obtained from plants mothers consisted of cuttings (explants) of capulí chaucha, proceeded to washing and disinfection was performed with drinking plenty of water for two minutes, then the solution of Savlon (Chlorhexidine 1.5% - Cetrimide 15%) was prepared more Povidyn (povidone iodine solution USP 10% and 1% available iodine), disinfection consisted of immersing the segments in three concentrations of sodium hypochlorite (10%, 15% and 20%) in two immersion times (5 to 10 minutes) in between  $\frac{1}{2}$  MS culture

For the establishment of the explants in the budding phase explants were placed sterile absorbent paper and with the help of forceps and scalpel cutting tissue revived the rusty parts, was placed in the means of sprouting  $\frac{1}{2}$  MS and N6 which was evaluated four doses of BAP (0.0; 0.3; 0.6; 0.9 ppm BAP), the bottles were sealed and labeled material was transferred to the grow room. Upon completion of this period proceeded with data collection variables: Days labrotación, number of shoots / explant and shoot length / explant. The experimental unit consisted of an explant carrying a pair of axillary buds. Statistical analysis was performed using a completely randomized design with six observations.

For the start of the rooting phase outbreaks that had the best results of the previous phase is selected is placed in the way of rooting MS  $\frac{1}{2}$  and  $\frac{1}{2}$  WPM with 40 grams of sucrose, 4gramos / liter of agar, 0.25 ppm Acid naphthalene acid (ANA), at different concentrations of indole butyric acid (0.0; 1; 2; 3 ppm IBA) the flasks were sealed and labeled. Vitroplants planted in this process, were transferred to culture room, to finish this period proceeded with making variable data; Rooting percentage, root length and number of roots. The experimental unit consisted of two outbreaks. Statistical analysis was performed using a completely randomized design with six observations.

From the results obtained it is concluded that for the disinfection phase of the explants was presented the best treatment t1 (NaClO 10%; 5 minutes) in a culture medium which had the lowest MS $\frac{1}{2}$  damage and reduced pollution obtaining explant explant anéxicos, at the stage of budding, the average MS  $\frac{1}{2}$  supplemented with 0.0 ppm of 6-benzylaminopurine (BAP) presented the best results for the days to sprouting and length of shoots in phase for rooting, the  $\frac{1}{2}$  WPM semisolid medium with 40 g of sucrose, 0.25 ppm base of naphthalene acetic acid (NAA) and supplemented with 2 ppm of indole butyric acid (IBA) allows favoring shorter plants rooting percentage and the length of the roots. According to the economic analysis for the process of in vitro disinfection, treatment t1: (10% NaClO; 5 minutes) presented the most profitable cost where you got Marginal Rate of Return of 37.29% in the rooting phase medium of more profitable crop was t5 (WPM / 2; 2 ppm BAP) since it allowed for a marginal return rate of 87.49%

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO, M. 2002. Biotecnología aplicada a la mejora de *Pelargonium*. Tesis Doctoral Madrid: Universidad Complutense de Madrid. p. 68-74
- ALTAMIRANO, ZAPATA, RJ; CEDILLO, A; MORALES, A. 1993. Propagación *in vitro* de durazno, *Prunus persica* (L.) Batsch, a partir de yemas axilares. Agricultura Técnica de México 19(1,2):37-50
- ARÉVALO, E, 2012. Datos tomados de la revista Pujilí 150 años de Cantonización. Consultado 13 nov 2014 disponible en: <http://margarita-lecturainteresante.blogspot.com/2012/05/datos-geograficos-de-pujili-ecuador.html>
- BARTHOLOMÄUS, A.; DE LA ROSA, A.; SANTOS, J.; ACERO, L.; MOOSBRUGGER, W. 1990 El Manto de la tierra Flora de los Andes: Guía de 150 especies de la flora andina. p. 121
- BERTHOULY, L. 1897. Curso regional sobre el cultivo de tejidos en café. Turrialba, CR. p. 22-80
- BIOCITY, ES. 2002. Hormonas vegetales (en linea). España. Consultado 10 ene 2014 Disponible en [biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm](http://biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm).
- BOTTI, C. 1992. Seminario sobre la producción de plantas in vitro. Quito, EC. PROEXANT p. 67
- CAMACHO, F. 1985. Eliminación de la dormición de semillas de capulín (*Prunus serotina* spp *capuli*), mediante el remojo y secado. Consultado 12 de ago 2014 Disponible en: <http://www.revistasinifap.org.mx/index.php/Forestales/article/view/1161/1159>
- CARDENAS, M. 1992. Proliferacion y enraizamiento in vitro de capulin (*Prunus serotina* Var. Capuli Ehrh). Colegio de Postgraduados, Montecillo. Consultado 24 mar 2014 Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX9502229>
- CÁCERES, K. 2004. Propagación in vitro de los portainjertos de cerezo (*Prunus avium* L.) Gisela 5 y *Prunus cerasus*, pp: 28, 79 Consultado 18 de abr 2014 Disponible en: [http://ucv.altavoz.net/prontus\\_unidacad/site/artic/20061214/pags/20061214132853.html](http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061214/pags/20061214132853.html)
- CASSELLS, A. 1991. Problems in tissue culture. In: Micropropagation: Technology and Application. Kluwer Academic Publishers, Rotterdam NL p. 31-44
- CASTELLASNOS, L., M. B. 2011. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana*. Habana, CU. Minag p. 15, 38
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR.). 2006. Gestión Integrada de Recursos Hídricos y Agroforestería en zonas Áridas, Semiáridas y Sub Húmedas Secas de América Latina. Consultado 12 oct 2014. Disponible en: [http://www.wafla.com/typo3conf/ext/naw\\_securedl/secure.php?u=0&file=uploads/media/Acacia\\_macracantha\\_Humboldt\\_\\_Bonpland\\_ex\\_Willdenow\\_.pdf&t=1284497255&hash=6dd0ad5a5c4346276ce03f48f2490d31](http://www.wafla.com/typo3conf/ext/naw_securedl/secure.php?u=0&file=uploads/media/Acacia_macracantha_Humboldt__Bonpland_ex_Willdenow_.pdf&t=1284497255&hash=6dd0ad5a5c4346276ce03f48f2490d31)

CESA (Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas, EC ) 1992; Usos Tradicionales de las Especies Forestales Nativas en el Ecuador CESA. Quito, EC. p. 16-18

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO) 1980. El Cultivo de meristemas de yuca. Cali, CO. p. 40

CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la biodiversidad). 2012. *Prunus serotina*. Guadalajara, MEX. Consultado 24 de feb 2014 Disponible en: <[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf)>. p. 56-60

CLOSAL, L.; CUEVA, A.; BALDOVINO, R. 1998. Cultivo *in vitro*. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, Departamento de Horticultura, Botánica y Jardinería, Unidad de Fisiología Vegetal, Madrid, ES. Consultado 14 de oct 2014 Disponible en: [www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm](http://www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm). p. 132-145

CUEVA, E. 2007. Información para la conservación de los bosques secos de Perú y Ecuador, Loja. EC. Consultado 13 nov 2014 Disponible en: [http://www.darwinnet.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=825:faique-catid=60](http://www.darwinnet.org/index.php?option=com_content&view=article&id=825:faique-catid=60)

CHANNUNTAPIPA, C.; SEDGLEY, G COLLINS 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Plus Ultra and hybrid rootstock Titan x Nemaguard. Sci. Hort. p. 98:473-484

CHISAGUANO, L., 2010. Evaluación de la aplicación de tres productos inductores de brotación en Capulí (*prunus capuli*), comunidad Quilajaló – Salcedo – Cotopaxi Tesis Ing. Agr. Cotopaxi: Universidad de Cotopaxi, Facultad de Ingeniería Agropecuaria. Consultado 13 nov 2014 Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/750>. p. 16-47

DAL ZOTTO, A. y DOCAMPO, D. 1997. Micropropagación de los portainjertos de ciruelo Mariana 2624 (*Prunus cerasifera* x *Prunus musionana*) y Pixy (*Prunus insistia* L.) de sanidad controlada. Phyton. (60):127-135

DEBERGH, P. 1982. Physical properties of culture media. In: Plant tissue culture. Japanese Association Plant Tissue Culture, Fujiwara, JP. p. 135-136

DIMASSI-THERIOU, K. 1995. *In vitro* rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. Journal of Horticultural Science 70(1):105-108

DODDS, J & ROBERTS, L. 2004. Experiments in Plant Tissue Culture. 3 ed. New york, US. s.e. p. 256

DOWNEY, L. & IEZZONI, A. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *J Amer Soc. Hotr. Sci*, 125(1):76-80

DREW, R. 1987. The effects of medium composition and cultural conditions on *in vitro* root initiation and growth of papaya (*Carica papaya* L.). Journal of Horticultural Science 62(4):551-556

ECHENIQUE, V., RUBISTEIN, C., & MROGINSKI, L. 2004, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires, AR. p. 32

ENJALRIC, F.; CARRON, P.; LARDET, L. 1998. Contamination of primary cultura bin tropical areas: The case of *Heveabra siliensis*. p. 225: 57-66

ELLIOT, T.; RAPLH, C.; BARBOUR, M. 1994. Botánica. California, US. 5 ed Limusa. p. 408-429

ESPINOSA, A.; PIJUT, CH.; MICHLER, H. 2006. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* in vitro cultures. HortScience 41:193-201

FLORES, J. 2008 Estudio del capulí e introducción en la cocina de la sierra ecuatoriana. Quito, EC Tesis de Ing. Ali.: Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Turismo y Preservación Ambiental, Hotelería y Gastronomía. Consultado el 23 de ene 2014 Disponible en: [http://repositorio.ue.edu.ec/bitstream/123456789/9380/1/34432\\_1.pdf](http://repositorio.ue.edu.ec/bitstream/123456789/9380/1/34432_1.pdf). p. 24

FLORES, M. 2012. El capulí es un fruto andino que se desarrolla y degusta en la serranía. El Comercio, Quito, EC. 25 feb 2012. Consultado 06 de ene 2014 Disponible en [http://www.elcomercio.com.ec/agromar/capuli-andino-desarrolla-degusta-Serrania\\_0\\_652134912.html](http://www.elcomercio.com.ec/agromar/capuli-andino-desarrolla-degusta-Serrania_0_652134912.html)

FUNIBER (Fundación Universitaria Iberoamericama). Composición nutricional del capulí. Consultado 12 de feb 2014. Disponible en: <http://composicionnutricional.com/alimentos/CAPULI-5>

GAVILANES, R.; FLOR, B. 1990. Evaluación de siete tratamientos pre germinativos y seis sustratos para la germinación de la semilla de capulí. Tesis de Ing. Agr. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agropecuaria p. 1-10

GAVINLERTVATANA, P., READ, P.; WILKINS F.; HEINS, R. 1982. Ethylene levels in flask atmospheres of *Dahlia pinnata* Cav. Leaf segments and callus cultured *in vitro* p. 107, 3-6

GÓMEZ, C.; RÍOS, D.; SÁNCHEZ, M. 2007. Efectos del subcultivo sucesivo de caulogénesis adventicia de Eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Concepción, CH. Universidad de Concepción. Centro de Biotecnología. Facultad de Ciencias Forestales. p. 97

GONZÁLEZ, G.; ALEMÁN, S.; TRUJILLO, R.; DOMECH, R.; ABREU, E. 2002. Influencia del 6 Bencilaminopurina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de Henequén obtenidas a partir de embriones. Consultado 15 de ene 2014. Disponible en: [http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc\\_download/71-bv0397-02-24235-238.html](http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_download/71-bv0397-02-24235-238.html)

GUIDOLIN, A. 2003. Regeneração de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de calos e transformação genética via *Agrobacterium*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Sao Paulo, BR. p. 27



PIRACICABA. Cultivo de tejidos Vegetales. Sao Paulo, BR. Consultado 8 jul 2014. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos67/cultivo-tejidos-vegetales/cultivo-tejidos-vegetales.shtml>.

JIMÉNEZ, M.; CASTILLO, I.; AZUARA, E.; BERISTAIN, C. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp capuli) extracts. Rev . Mex. Tesis de Ing. Química

HARTMANN, H; KESTER, D. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. Monterey, MX, CECSA. p. 814

HLATKY, A 1990. El Capulí: Informe preliminar de dos variedades y cuatro sistemas de formación. Quito, Ecuador, INIAP. p. 284

HUMPHRIES, C. 1960. Kinetin inhibited root formation on leaf petioles of detached leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant* 13:659-663

HURTADO, D.; MERINO, M. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México DF, MX. Trillas. p. 15-34

IRIONDO, J.; DE LA IGLESIA, M. Y PÉREZ, C. 1995. Micropropagation of *Eleagnus angustifolia* from mature tress. *Tree Physiology* p. 65-115

KYLE, L.; KLEY, J. 1996. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. 3 ed. Timber Press, Hong Kong, CHN. 240 p.

KRIKORIAN, A. 1991. Propagación clonal *in vitro*. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali, CO . CIAT. p. 95-125

LEIPZIG, 1996. Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los Recursos Fitogenéticos. Quito, EC, Consultado 12 de ago del 2014 Disponible en: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/SoW1/americas/ECUADOR.pdf>.

LEVITUS, G. 2008. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Buenos Aires, AR. INTA. p. 67

LLOYD, G.; McCOWN, B. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* 30:421-427

MALAGAÑON, J., C.E. 2005. Materias activas y preparados. In C.E. Malagañon J. Productos Fitosanitarios, s.l. Ocapa p. 14

MARÍN, A.; BAUDABOUS, M.; LORENTE, P.; GRACÍA, E.; ANDREU, P.; & ARBELOA, A. 2010. Saneamiento *in vitro* de Douce de Djerba, una variedad de manzano micropropagada ITEA- Información Técnica Económica Agraria. Zaragoza, ES p. 106; 303-307

McVAUGH, R. 1951. A revision of the North American black cherries (*Prunus serotina* Ehrh. and Relatives). *Brittonia*. 7(4):279-315

- MUÑOZ, I.; REYES, H. 2006. Reguladores de crecimiento, L-Cisteína y Ácido Ascórbico en el Cultivo *in vitro* de Mora (*Rubus glaucus Benth*), Universidad Nacional Agraria, Managua, NI. Consultado 03 mar. 2014. Disponible en: <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf01m967.pdf>
- NATIONAL ACADEMY 1989. Lost Crops of the Incas. Ambato, EC. Universidad Técnica de Ambato. p. 223- 227
- NICANOR, M. 2012. Rescate del capulí. Pujilí, Pujilí, EC. Consultado el 20 de agosto del 2014 Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n\\_Pujil%C3%AD](http://es.wikipedia.org/wiki/Cant%C3%B3n_Pujil%C3%AD)
- OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consultado 15 de Agosto del 2014 Disponible: <http://www.biblioteca.org.ar/libros/150415.pdf>. p. 345-368
- OROZCO, C. 1996. Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en agricultura. *In* Simposio nacional sobre cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, GT, USAC. p. 1-9
- PALACIOS, W. 2011. Árboles del Ecuador. Ministerio del Ambiente-Gobierno Nacional de la República del Ecuador. Quito, EC. Grupo Comunicacional Efigie. p. 23-45
- PAN, M.; VAN, STADEN. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. New York, US. Plant Growth Regulation. 26:155-163
- PATI, P.; RATH, S.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, PS. 2005. *In vitro* propagation of rose – a review. Amritsar, IN, Consultado 10 jun 2014 Disponible en: [http://www.aseanbiotechnology.info/scripts/count\\_article.asp?Article\\_code21018038](http://www.aseanbiotechnology.info/scripts/count_article.asp?Article_code21018038)
- PELACHO, A., CLOSA, L., CUEVA, R., SANFELIU, J., BADÍA, J. Y ALINS, G. 200. Cultivo *in vitro* *In*. Unidad de Fisiología Vegetal del Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida. Consultado 13 de nov Disponible en: <http://www.etsea2.udl.es/invitro/indice.htm>
- PÉREZ, E., RAMÍREZ, R., NUÑEZ, H. Y OCHOA, N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Apoyado por el Fondo para la Modernización de la Educación Superior, Aguas Calientes, MX . FOMES. p. 12:15-35
- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands, NL. Martinus Nijhoff Publishers. p. 343
- POPENOE, W. & A. PACHANO. 1922. The capulin cherry. California, US. Journal of Heredity. p. 13, 50-62
- PRUSKI, K.; ASTATKIE, T. Y NOWAK J. 2005. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nankin cherry (*Prunus tormentosa*). *In*; Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Toronto, s.e. CA. p. 3-8
- RAINFOREST, US. 2002 Medios de cultivo para tejidos vegetales *in vitro* (en línea). US. Consultado 15 sep 2014 Disponible en: [geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm](http://geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm). p. 4

- RAMÍREZ, M.; SALAZAR, E. 1997. Establecimiento “*in vitro*” de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista Agronómica (Luz). p. 14: 497- 506
- RAMÍREZ, M., LEÓN, S.; URDANETA, A. 1999. Evaluación de desinfectantes superficiales en el establecimiento “*in vitro*” de *Psidium guajava* L. y *Psidium riedrich thalianum* (Berg) Nierdz. Revista Agronómica. 16: 243-255
- RECALDE, C. 2007. Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepetahedera ceavariiegata*, Tabacundo – Pedro Moncayo. Tesis de Ing. Agr. Escuela Politecnica del Ejercito, Carrear de Ingenieria Agropecuaria, Quito, EC. Consultado 12 de Agosto del 2014 Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec>
- RÍOS, M., KOZOIOL, M.J., BORGTOFT, H., GRANDA, G. 2008. Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas, Quito, EC. Abya-Yala. p. 23-67
- RODRÍGUEZ, R.; DAQUINTA, M.; CAPOTE, I.; PINA, D.; LEZCANO, Y.; GONZÁLEZ, J. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogany* (Caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). Revista Científica Cultivos Tropicales. 24(3): 23-27
- ROCA, W.; MROGINSKI, L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura-Fundamentos y aplicaciones. Calí, CO. p. 1039
- \_\_\_\_\_. 1997. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 130.
- RUZIC, D.; MSARIC, R.; CEROVIC, L.; CULATIF, A.; 2000 Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Belgrade, YU. Consultado: 23 de jul 2014 Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1006412901992#page-1>
- SÁNCHEZ, P.; VITERI J. 1981. Estudio de frutales de hoja caduca en el cantón Ambato. Tesis de grado de Ing. Agr. Ambato EC. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencias Agrícolas, p. 10- 27; 248-25
- SÁNCHEZ DE CASTRO F. 1993. Agricultura, Biotecnología y Propiedad Intelectual, San José, CR. p. 35-78
- SÁNCHEZ, N.; REBOLLEDO, V.; MATA, M. 2002. Inducción de brotación múltiple en *Diospyros riojae* por medio del cultivo de tejidos vegetales. México Df., MX. Latindex. 4: 41-46
- SCHOENE, G. Y YEAGER, T. 2005. Micropropagation of sweet viburnum ( *Viburnum odoratissimum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. University of California, California, US. p. 154-167
- SEGOVIA, R. ;LAING, D. 1991. Casa de malla de tipo II para adaptación de las plantas. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali, CO, CIAT. p. 46-78
- SKOOG, F.; MILLER, C. 1975. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium Society Exposition Biological. Cambridge University Press. p. 11:118-131

SPIER, H.; BIEDERBICK C. 1980. Árboles y leñosas para reforestar las tierras altas de la región interandina del Ecuador. 2° ed. Quito, EC, Consejo Provincial del Ecuador. p.21-23

STYER, D.; CHIN, C. 1983. Meristem and shoot-tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm conservation. Horticultural Reviews. p. 221-227

SOTOLONGO R. 1999. Propagación de *Psidium salutare* por cultivo in vitro. Tesis de Maestría. Pinar del Río, CU. Universidad de Pinar del Río. Facultad de Forestal y Agronomía. Pinar del Río, CU. p. 6

SUÁREZ, I.; SCHNELL, R.; KUHN, D. Y LITZ, R. 2005. Micrografting of ASBVdinfected avocado (*Persea americana*) plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Armenia, CO, s.e. p. 4-12

SUDHA, C.; KRISHNAN, P.; PUSHPANGADAN, P. Y SEENI, S. 2005. In vitro propagation of *Decalepis arayalpathra*, a critically endangered ethnomedicinal plant. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. Consultado el 21 de mar 2014 Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1079%2FIVP2005652#page-1>

THORPE, T. A. 1991. Organogenesis in vitro: Structural, physiological and biochemical aspects. In: Vasil, I. K (ed). Perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, New York, US. p. 71-111

TRAVERS, J.; STARBUCK, C.; NATARELLA, N.J. 1985. Effects of Culture Medium on *In Vitro* Rooting of Antonovka 313 Apple. HortScience. 20 (6):1051-1052

URIBE, M. ; CIFUENTES, G. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia concinna*. Universidad Concepción, Concepción, CH, Consultado 12 de mar 2014 Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-2002004000100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-2002004000100012&script=sci_arttext)

VÁZQUEZ, B E.; TORRES, G S. 1995. Fisiología Vegetal. La Habana, CU. Pueblo y Educación. p. 320

VILLALOBOS, A. 1982. Tissue culture applied to ornamental species. In: Micropropagation of selected root crop, ornamental species, Montecillo, MX, s.e. p. 155-164

## 9. ANEXO

### Anexo 1. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) a la mitad de concentración de sales (MS) para cultivo *in vitro*.

Stock	Sales	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (mg/l)	Volumen a usar (ml/l)
<b>I</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	1 650	10
	K NO <sub>3</sub>	95.0	1 900	
	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37.0	370	
<b>II</b>	Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	2.23	22.3	5
	Zn SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1.058	10.6	
	Cu SO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.0025	0.025	
<b>III</b>	Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	44.0	440	5
	KI	0.083	0.83	
	Co Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	
<b>IV</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.0	170	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62	6.2	
	NaMoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.025	0.25	
<b>V</b>	Fe SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.784	27.85	5
	Na <sub>2</sub> EDTA	3.724	37.25	
	Ácido nicotínico	100 ppm	0.5	
<b>Vitaminas</b>	PiridoxinaHCl	100 ppm	0.5	5
	Tiamina HCl	100 ppm	0.1	1
	Glicina	100 ppm	2.0	20
	Myoinositol	10 000 ppm	100	10
	Sacarosa		30 000	
	Agar		7 000	
pH 5.8				

**Anexo 2. Composición del medio de cultivo Chu (1962) a la mitad de concentración de sales (N6) para cultivo *in vitro*.**

Stock	Sales	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (mg/l)	Volumen a usar (ml/l)
<b>I</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	23.15	453	10
	K NO <sub>3</sub>	141.5	2830	
<b>II</b>	Mg SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	18.5	185	10
	Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.30	4.40	
	Zn SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.15	1.50	
<b>III</b>	Ca Cl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	12.53	166	10
	KI	0.08	0.80	
<b>IV</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40	400	10
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.16	1.60	
<b>V</b>	Fe SO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.784	27.80	10
	Na <sub>2</sub> EDTA	3.73	37.30	
<b>Vitaminas</b>	Ácido nicotínico	0.15	1.50	10
	PiridoxinaHCl	0.15	1.50	10
	Tiamina HCl	0.30	3.00	10
	Glicina	0.20	2.00	10
	Myoinositol	10 000 ppm	100	0,05
	Sacarosa		30 000	15
	Agar		7 000	4,00
pH 5.7				

**Anexo 3. Composición del medio de cultivo WPM a la mitad de concentración de sales para cultivo *in vitro*.**

Stock	Sales	Concentración inicial (g/l)	Concentración final (mg/l)	Volumen a usar (ml/l)
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20.00	400	10
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	27.8	556	
<b>B</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	49.5	990	10
<b>C</b>	Ca Cl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	19.2	96	2.5
<b>D</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34.0	170	2.5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.24	6.2	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05	0.25	
<b>E</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	74.0	370	2.5
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.38	16.9	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.72	8.6	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.05	0.025	
<b>F</b>	Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.57	27.8	2.5
	Na <sub>2</sub> EDTA	7.45	37.3	
<b>G</b>	Tiamina HCl	0.2	1.0	5
	Ácido nicotínico	0.1	0.5	
	PiridoxinaHCl	0.1	0.5	
	Glicina	0.4	2.0	
<b>H</b>	Myoinositol	20.0	100	5
	Sacarosa			20
	Agar			7
pH 5.6				

**Anexo 4.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para la variable días a labrotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	días_brotación
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,035
Sig. asintót. (bilateral)	0,235

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas**

Variable dependiente: días\_brotacion

F	gl1	gl2	Sig.
1,600	7	40	,164

**Anexo 5.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para la variable número de yemas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	número_yemas
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,863
Sig. asintót. (bilateral)	0,446

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: RE\_numero\_yemas

F	gl1	gl2	Sig.
2,563	7	40	,052



**Anexo 6.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para la variable días a longitud del brote en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	altura_brote
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,840
Sig. asintót. (bilateral)	0,481

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: RE\_altura\_brote

F	gl1	gl2	Sig.
,833	7	40	,567

**Anexo 7.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov Levene para la variable porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	porcentaje_enraizamiento
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,764
Sig. asintót. (bilateral)	0,603

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: RE\_porcentaje\_raiz

F	gl1	gl2	Sig.
1,841	7	40	,106

**Anexo 8.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Levene para la variable días a longitud de la raíz en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	longitud _raíces
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,104
Sig. asintót. (bilateral)	0,174

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: RE\_longitud\_raiz

F	gl1	gl2	Sig.
1,141	7	40	,358

**Anexo 9.** Prueba de Kolmogorov-Smirnov para la variable días a número de raíces en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

	número _raíces
N	48
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,858
Sig. asintót. (bilateral)	0,454

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: RE\_numero\_raiz

F	gl1	gl2	Sig.
,853	7	40	,551

**Anexo 10.** Datos de la variable días a la brotación en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	11	11	11	12	10	10	<b>65,00</b>	10,83
m1b1	10	10	10	11	11	11	<b>63,00</b>	10,50
m1b2	11	11	11	12	11	13	<b>69,00</b>	11,50
m1b3	12	12	13	12	12	13	<b>74,00</b>	12,33
m2b0	10	10	9	13	10	11	<b>63,00</b>	10,50
m2b1	13	13	10	11	11	9	<b>67,00</b>	11,17
m2b2	13	11	12	12	12	13	<b>73,00</b>	12,17
m2b3	12	13	12	11	11	12	<b>71,00</b>	11,83

**Anexo 11.** Datos de la variable longitud del brote en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	2,9	2,50	2,80	2,70	3,10	2,50	<b>16,50</b>	2,75
m1b1	3,1	2,60	2,90	2,80	2,50	2,60	<b>16,50</b>	2,75
m1b2	2,6	2,70	2,60	2,80	2,60	2,40	<b>15,70</b>	2,62
m1b3	2,3	2,80	2,40	2,70	2,20	2,50	<b>14,90</b>	2,48
m2b0	3,2	2,70	3,20	3,00	2,70	2,50	<b>17,30</b>	2,88
m2b1	2,4	2,60	2,50	2,40	2,70	3,00	<b>15,60</b>	2,60
m2b2	2,8	3,40	3,00	2,70	2,90	2,70	<b>17,50</b>	2,92
m2b3	2,3	2,70	2,30	2,50	2,20	2,80	<b>14,80</b>	2,47

**Anexo 12.** Datos de la variable número de yemas en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	5	5	5	6	6	5	<b>32,28</b>	5,38
m1b1	4	4	4	4	4	5	<b>25,42</b>	4,24
m1b2	4	3	4	5	4	3	<b>23,11</b>	3,85
m1b3	3	4	3	4	4	4	<b>21,19</b>	3,53
m2b0	5	5	5	5	4	6	<b>29,87</b>	4,98
m2b1	4	4	3	6	6	4	<b>26,60</b>	4,43
m2b2	4	4	6	3	4	4	<b>25,28</b>	4,21
m2b3	3	4	3	3	3	4	<b>19,73</b>	3,29

**Anexo 13.** Datos de la variable porcentaje de enraizamiento en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	23,00	45,00	34,00	28,00	43,00	56,00	<b>229,00</b>	38,17
m1b1	72,00	76,00	10,00	62,00	32,00	69,00	<b>321,00</b>	53,50
m1b2	78,00	96,00	89,00	75,00	53,00	72,00	<b>463,00</b>	77,17
m1b3	56,00	47,00	77,00	89,00	62,00	78,00	<b>409,00</b>	68,17
m2b0	23,00	41,00	37,00	47,00	59,00	62,00	<b>269,00</b>	44,83
m2b1	87,00	76,00	65,00	71,00	83,00	56,00	<b>438,00</b>	73,00
m2b2	78,00	94,00	92,00	76,00	64,00	84,00	<b>488,00</b>	81,33
m2b3	59,00	76,00	84,00	68,00	93,00	87,00	<b>467,00</b>	77,83

**Anexo 14.** Datos de la variable longitud de la raíz en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	12,00	12,00	10,00	12,00	10,00	13,00	<b>69,00</b>	11,50
m1b1	14,00	14,00	14,00	2,00	15,00	23,00	<b>82,00</b>	13,67
m1b2	13,00	12,00	18,00	15,00	25,00	12,00	<b>95,00</b>	15,83
m1b3	15,00	10,00	19,00	16,00	23,00	13,00	<b>96,00</b>	16,00
m2b0	13,00	18,00	17,00	10,00	13,00	13,00	<b>84,00</b>	14,00
m2b1	13,00	14,00	12,00	15,00	14,00	15,00	<b>83,00</b>	13,83
m2b2	13,00	13,00	17,00	21,00	18,00	13,00	<b>95,00</b>	15,83
m2b3	17,00	12,00	14,00	18,00	16,00	25,00	<b>102,00</b>	17,00

**Anexo 15.** Datos de la variable número de raíces evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de Capulí (*Prunus serotina ssp capulí Cav*). Quito, Pichincha. 2014

	OBSERVACIONES							
TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	SUMATORIA	PROMEDIO
m1bo	2	2	3	3	3	2	<b>16,65</b>	2,78
m1b1	3	3	3	4	3	3	<b>19,03</b>	3,17
m1b2	3	3	4	4	4	3	<b>21,31</b>	3,55
m1b3	3	3	4	4	3	4	<b>20,93</b>	3,49
m2b0	3	3	3	3	3	3	<b>18,02</b>	3,00
m2b1	4	4	3	3	4	3	<b>21,12</b>	3,52
m2b2	3	4	4	4	3	4	<b>22,81</b>	3,80
m2b3	3	4	3	3	3	3	<b>19,38</b>	3,23

**Anexo 16.** Costos de producción en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de capulí (*Prunus serotina ssp capuli*) a partir de segmentos nodales. Quito, Pichincha. 2014

<b>COSTOS FIJOS</b>				
<b>Rubro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio Unitario (USD)</b>	<b>Valor Total USD</b>
<b>Insumos</b>				
Explantos	Kg	10,00	3,00	30,00
<b>Subtotal</b>				<b>30,00</b>
<b>Materiales</b>				
Vasos de Precipitación	Unidad	8,00	1,15	9,20
Probetas	Unidad	1,00	1,56	1,56
Puntas para micropipeta	Unidad	2,00	0,13	0,26
Piceta	Unidad	1,00	2,00	2,00
Pinzas	Unidad	2,00	1,25	2,50
Mango de bisturí	Unidad	1,00	1,45	1,45
Termómetro	Unidad	1,00	1,35	1,35
Marcador	Unidad	1,00	0,75	0,75
<b>Subtotal</b>				<b>19,07</b>
<b>Servicios</b>				
Agua potable	m <sup>3</sup>	1,00	0,40	0,40
Luz eléctrica	KWh	1.000,00	0,03	30,00
<b>Subtotal</b>				<b>30,40</b>
<b>Equipos</b>				
Depreciación de equipos	Mensual	10,00	37,98	379,80
<b>Subtotal</b>				<b>379,80</b>
<b>Salario</b>				
Tesista	Mensual	10,00	180,00	1.800,00
<b>Subtotal</b>				<b>1.800,00</b>
<b>Subtotal Costos Fijos</b>				<b>2.259,27</b>
<b>COSTOS VARIABLES</b>				
<b>Rubro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Precio Unitario (USD)</b>	<b>Valor Total USD</b>
<b>Reactivos</b>				
MS/2	litro	20,00	1,20	24,00
N6	litro	20,00	1,80	36,00
WPM/2	litro	20,00	1,10	22,00
Bencil Adenina (BAP)	g	0,01	18,00	0,18
Ácido Indol Butírico (IBA)	g	0,01	15,40	0,15
Ácido Naptalenacético (ANA)	g	0,01	11,40	0,11
NaOH	litro	0,10	0,05	0,01
HCl	litro	0,10	0,05	0,01
Povidine	litro	0,25	1,50	0,38
Savlón	litro	0,25	3,25	0,81

(Anexo 16 cont..)				
Benomil	g	0,10	4,50	0,45
Carbón activo	g	0,10	0,01	0,001
Azoxistrobina	g	0,10	4,80	0,48
<b>Subtotal</b>				84,58
<b>Materiales</b>				
Frascos 350 ml	unidad	100,00	0,07	7,00
Aluminio	60.9m*3 0.4cm	1,00	3,50	3,50
Rolopac	1400m*4 5cm	1,00	8,00	8,00
Alcohol	galón	1,00	9,00	9,00
Hipoclorito de sodio	galón	1,00	5,00	5,00
Detergente	kg	1,00	3,00	3,00
Hojas de bisturí	unidad	5,00	0,19	0,95
Gas	tanque	1,00	2,00	2,00
Servilletas	unidad	2,00	0,35	0,70
Mascarilla	unidad	2,00	0,05	0,10
Gorro	unidad	2,00	0,23	0,46
<b>Subtotal</b>				39,71
<b>Subtotal Costos Variables</b>				124,29
<b>Imprevistos 5 %</b>				6,21
<b>Total</b>	planta	2.304,00		2.389,77
<b>Costo de producción por planta (laboratorio)</b>				1,04

**Anexo 17.** Costos variables por tratamiento utilizados para la desinfección en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de capulí (*Prunus serotina ssp capuli*) a partir de segmentos nodales. Quito, Pichincha. 2014

<b>Tratamientos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo total</b>
<b>Tratamiento 1</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	20	0,009	0,18
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,76</b>
<b>Tratamiento 2</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	20	0,009	0,18
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,76</b>
<b>Tratamiento 3</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	30	0,009	0,27
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,85</b>
<b>Tratamiento 4</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	30	0,009	0,27
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,85</b>
<b>Tratamiento 5</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	40	0,009	0,36
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Tratamiento 6</b>				
Alcohol	ml	10	0,024	0,24
Cloro	ml	40	0,009	0,36
Fungicidas	g	7	0,0225	0,1575
Antibacterial	ml	15	0,012	0,18
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Total</b>				<b>5,09</b>



**Anexo 18.** Costos variables por tratamiento utilizados para la etapa de brotación

Tratamientos	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
<b>Tratamiento 1</b>				
MS/2	ml	1	1,2	1,2
BAP	ml	0	0,0024	0,0
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>1,20</b>
<b>Tratamiento 2</b>				
MS/2	l	1	1,2	1,2
BAP	ml	2,5	0,0024	0,006
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>1,21</b>
<b>Tratamiento 3</b>				
MS/2	l	1	1,2	1,2
BAP	ml	5	0,0024	0,012
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>1,21</b>
<b>Tratamiento 4</b>				
MS/2	l	1	1,2	1,2
BAP	ml	7,5	0,0024	0,018
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>1,22</b>
<b>Tratamiento 5</b>				
CHU	ml	1	0,9	0,9
BAP	ml	0	0,0024	0
ANA	ml	0,25	0,004	0,001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>0,90</b>
<b>Tratamiento 6</b>				
CHU	ml	1	0,9	0,9
BAP	ml	2,5	0,0024	0,006
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>0,9075</b>
<b>Tratamiento 7</b>				
CHU	ml	1	0,9	0,9
BAP	ml	5	0,0024	0,012
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>0,9135</b>
<b>Tratamiento 8</b>				
CHU	ml	1	0,9	0,9
BAP	ml	7,5	0,0024	0,018
ANA	ml	0,025	0,004	0,0001
Ácido giberélico	ml	0,15	0,009	0,00135
<b>Subtotal</b>				<b>0,9195</b>
<b>Total</b>				<b>8,48</b>

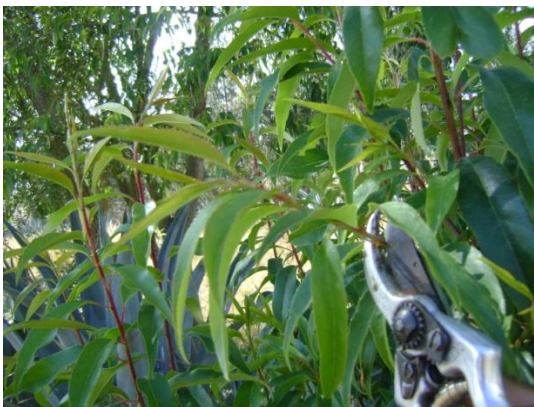
**Anexo 19.** Costos variables por tratamiento utilizados para la fase de enraizamiento

Tratamientos	Unidad	Cantidad	Costo unitario	Costo total
<b>Tratamiento 1</b>				
MS/2	l	1	1,2	1,2
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0	0,004	0
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>1,24</b>
<b>Tratamiento 2</b>				
MS/2	ml	1	1,2	1,2
BAP	ml	0,0025	0,0024	0,000006
IBA	ml	0,025	0,004	0,0001
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>1,24</b>
<b>Tratamiento 3</b>				
MS/2	ml	1	1,2	1,2
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0,05	0,004	0,0002
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>1,24</b>
<b>Tratamiento 4</b>				
MS/2	ml	1	1,2	1,2
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0,75	0,004	0,003
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>1,24</b>
<b>Tratamiento 5</b>				
WPM/2	l	1	0,9	0,9
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0	0,004	0
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Tratamiento 6</b>				
WPM/2	l	1	0,9	0,9
BAP	ml	1	0,0024	0,0024
IBA	ml	0,25	0,004	0,001
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Tratamiento 7</b>				
WPM/2	l	1	0,9	0,9
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0,5	0,004	0,002
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Tratamiento 8</b>				
WPM/2	l	1	0,9	0,9
BAP	ml	0,25	0,0024	0,0006
IBA	ml	0,75	0,004	0,003
Sacarosa	g	10	0,004	0,04
<b>Subtotal</b>				<b>0,94</b>
<b>Total</b>				<b>8,74</b>

**Anexo 20.** Fotografías de selección, lavado, desinfección de explantes en la evaluación de medios de cultivo para la micropropagación *in vitro* de capulí (*Prunus serotina ssp capuli*) a partir de segmentos nodales. Quito, Pichincha. 2014



Selección de planta donadora



Corte de ramilla seleccionada



Transporte de ramillas en fundas de zilopac



Corte de la ramilla



Defoliación de la ramilla



Obtención de segmentos nodales



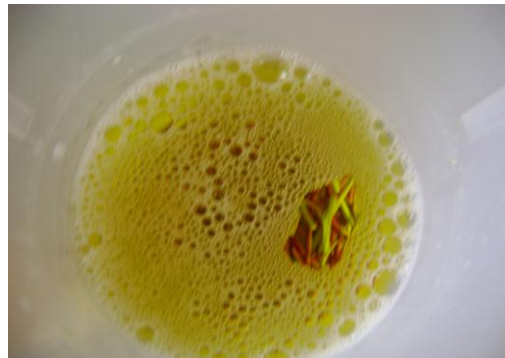
Segmentos nodales en agua potable



lavado de los segmentos con agua potable



Solución de Savlón



inmersión de los segmentos



Colocación del detergente



Enjuague con agua desionizada



Solución de Povidyne





Solución de Benopac



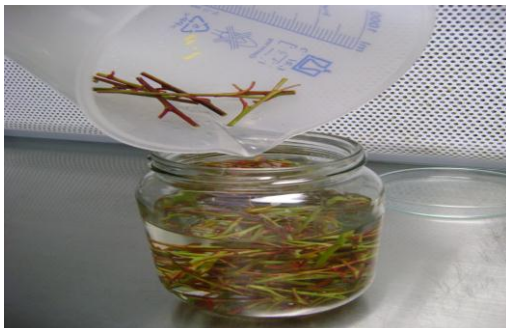
Enjuague con agua desionizada



Inmersión de los segmentos en alcohol



Enjuague con agua desionizada estéril



Colocación de NaClO al 10%



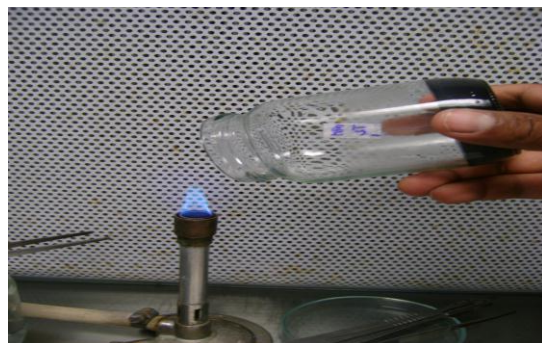
enjuague con agua desionizada estéril



Colocación de ácido cítrico



Corte de las partes expuestas al  $\text{NaClO}$

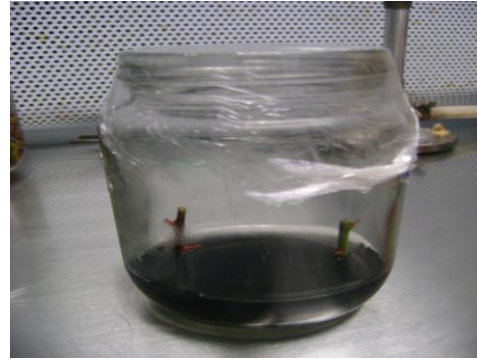


Flameado del frasco



Siembra de los segmentos





Sellado de los frascos con rollo pack



Resultado de aparición de brotes



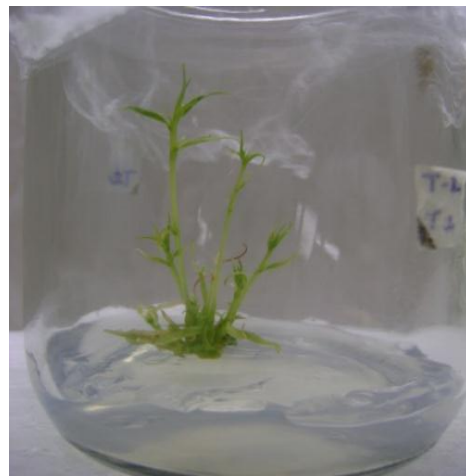
Resultado de longitud de los brotes



Extracción del brotes para subcultivo



Siembra de los explantes para subcultivo



Resultado de los subcultivos







Siembra de vitroplantulas para el enraizamiento



Resultado de enraizamiento